

l'infertilità maschile oggi

editor: Giovanni M. Colpi

1 / 2001

*A Giorgio Pardi,
Maestro della Ginecologia,
che per primo ha istituzionalmente
affiancato gli andrologi ai ginecologi
nella diagnosi e nella cura dell'infertilità*

PREFAZIONE

La fecondazione in vitro mediante ICSI è uno strumento formidabile nelle mani dei tecnici della riproduzione, cui consente oggi di far procreare coppie destinate fino a pochi anni or sono a rimanere irrimediabilmente sterili.

L'esperienza clinica quotidiana dimostra tuttavia, e sempre più spesso, da un lato un ricorso pressoché sistematico a tale procedura nella gestione dell'infertilità di coppia, e dall'altro la rinuncia preventiva, spesso acritica, ad ogni altro trattamento dell'infertilità maschile proteso, laddove possibile, ad ottenere gravidanze spontanee, trascurando addirittura la ricerca delle cause delle dispermie. Quest'ultimo comportamento, mal giustificato anche dalle considerazioni economiche talvolta adottate, ci sembra rispondere poco a criteri sia etici che scientifici.

Questa serie di volumi, programmati per uscire con cadenza regolare, intende contribuire a rafforzare l'opera svolta dalle Società Scientifiche andrologiche: *la formazione e l'informazione permanente del clinico dell'infertilità maschile*, al fine di rendere più incisivo e più consono alle esigenze dell'etica e del sapere clinico e scientifico il suo ruolo operativo nella gestione delle coppie infertili.

Il materiale che verrà via via presentato al lettore è costituito da articoli di overview su argomenti clinici di attualità, scritti in larga misura da noti esperti internazionali ed in minor parte derivati dalla nostra pluriennale esperienza clinica. Su ogni argomento trattato verrà comunque privilegiata la autorevolezza degli Autori alla convergenza delle loro opinioni.

Questo nostro lavoro costituisce l'ideale prosecuzione di un obiettivo che già anni addietro avevamo iniziato a perseguire con i volumi *Diagnosing Male Infertility* e *Treating Male Infertility*. Il compito odierno è altrettanto ambizioso ma, considerati il numero e la rilevanza degli esperti già coinvolti in questa iniziativa, confidiamo di riuscire a soddisfare le aspettative dei colleghi che si accostano all'infertilità maschile.

Giovanni M. Colpi

PRESENTAZIONE

La diagnostica del maschio infertile si basa oggi su indagini pressochè non invasive, tra le quali quelle ecografiche hanno certamente un ruolo di primo piano per la facilità di esecuzione ed il costo contenuto. Parallelamente a quanto è per il ginecologo, anche l'andrologo dovrebbe essere un ecografista dell'apparato di competenza. Abbiamo pertanto strutturato i primi due articoli di questo volume come dei mini-atlanti ecografici dei testicoli e delle vie seminali: ciò dovrebbe aiutare il lettore ad orientarsi più facilmente tra le componenti secretoria ed ostruttiva delle di-spermie, ed a sospettare il tipo delle eventuali patologie ostruttive.

La parte sul color-doppler scrotale è stata integrata da dati clinici, ed anche da opinioni personali frutto dell'esperienza di oltre quindici anni di indagini strumentali applicate all'attività chirurgica.

Nel terzo articolo vengono presentate le varie tecniche chirurgiche per tentare di ripristinare la fertilità spontanea nelle ostruzioni delle vie seminali prossimali, inclusa la recente e promettente tecnica di Marmar (semplificazione della analogia di Berger). La possibilità di una ricostruzione della via seminale appare oggi eccessivamente trascurata nella pratica clinica: abbiamo osservato troppi pazienti già inviati alla ICSI con TESE senza esito positivo che erano portatori di ostruzioni correggibili. La microchirurgia ricostruttiva dovrebbe essere sempre a disposizione di un Andrologo, o per proprie capacità personali o attraverso specifiche collaborazioni con colleghi esperti.

Il recupero per ICSI di spermatozoi nelle forme non-ostruttive di azoospermia è argomento di attualità capitale. In queste forme troppo spesso abbiamo osservato il ricorso alla sola tecnica dell'agoaspirato, con i suoi magri risultati. Nel quarto articolo vengono valutate tutte le tecniche in uso con i loro limiti, e l'autore presenta le basi empiriche e scientifiche della tecnica microchirurgica oggi nota con il suo nome.

Infine, di ICSI si parla correntemente nella gestione quotidiana dell'infertilità maschile: perciò ci è sembrato utile riproporre una serie organica di informazioni metodologiche su tale procedura in una Appendice destinata ai giovani andrologi.

G.M.C.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i colleghi Cristina Grugnetti, Luciano Negri e Guido Piediferro per l'oscuro ma prezioso lavoro di allestimento dei testi.

INDICE

“Ecografia ed ecocolordoppler scrotale”

Giovanni M. Colpi e Luciano Negri

pp. 7 - 26

“Ecografia prostatico-vescicolare transrettale”

Fabrizio Scropo e Renzo Benaglia

pp. 27 - 38

“Ricanalizzazione microchirurgica della via seminale prossimale”

José M^a Pomerol

pp. 39 - 52

“Recupero chirurgico degli spermatozoi : che metodo utilizzare?”

Peter N. Schlegel

pp. 53 - 65

APPENDICE :

“Microiniezione intracitoplasmatica del singolo spermatozoo”

Francesca Taricco e Eleonora Cefalù

pp. 69 - 80

ECOGRAFIA ED ECOCOLORDOPPLER SCROTALE

Giovanni M.Colpi e Luciano Negri

Servizio di Andrologia, Ospedale San Paolo - Polo Universitario (Milano)

Introduzione

L'ecografia e l'ecocolordoppler scrotale (ES) vengono utilizzati per lo studio di patologie urologiche come le orchiepididimiti acute o sub-acute, le neoplasie testicolari, i traumi scrotali e le grosse cisti dell'epididimo (*Rifkin et al. 1984; Hamm, 1994, Watson & Older, 1994*). La recente disponibilità di apparecchiature e di sonde ad alta definizione hanno ampliato la loro applicazione anche allo studio della infertilità maschile, ove spesso le alterazioni delle gonadi e degli annessi scrotali risultano sfumate e richiedono una valutazione molto attenta.

Indicazioni alla ES nell'infertilità maschile

- 1) Confermare o documentare patologie il cui trattamento medico o chirurgico può migliorare la qualità del seme:
 - Varicocele
 - Anomalie epididimarie compatibili con ostruzione parziale o completa dell'organo
 - Idrocele
 - Malposizionamenti delle gonadi
- 2) Riconoscere patologie responsabili di dispermia, non correggibili (l'unica soluzione rimane la fecondazione medicalmente assistita):
 - Orchiopatia secretoria (*Lenz et al., 1993*)
 - Microlitiasi testicolare (*Weinberg et al., 1973*)
 - Ectasia della rete testis (*Brown et al, 1992*)
- 3) Riconoscere patologie interferenti con la salute generale del paziente:
 - Carcinoma non palpabile del testicolo

Non è da sottovalutare poi il fatto che la documentazione ultrasonografica viene oggi spesso utilizzata come elemento probatorio nei sempre più frequenti casi di contenzioso tra medico e paziente, e pertanto una ES accuratamente refertata è auspicabile prima di proporre qualsiasi tipo di intervento chirurgico inerente la fertilità maschile.

L'ES dovrebbe essere sempre proposta nel paziente dispermico. Nel paziente infertile normozoospermico andrebbe proposta quando i dati anamnestici [pregressi traumi scrotali, episodi di orchialgia, infezioni delle vie seminali (=MAGI), ecc.], palpatori (irregolarità mono- o bilaterale delle gonadi o degli epididimi o dei funicoli, varicocele, idrocele) o seminologici (calo progressivo dei parametri seminali) facciano sospettare l'esistenza di patologie in grado di degradare nel tempo la qualità seminale, come per esempio il varicocele (*Witt & Lipshultz, 1993*) o le patologie (sub)ostruttive dell'epididimo (*Jequier et al., 1983*).

Anomalie ultrasonografiche: prevalenza nella popolazione maschile infertile

La prevalenza delle anomalie ultrasonografiche degli organi intrascrotali (Tabella 1) risulta più elevata negli infertili rispetto alla popolazione generale (~ 30%) (*Leung et al., 1984*).

Come si può notare nella Tabella 1 esistono differenze nella prevalenza delle singole anomalie tra le varie casistiche. Queste differenze sono certamente da attribuire ad alcuni biases:

- la preselezione dei pazienti che si sono rivolti a Centri di Infertilità di 2° livello che si qualificano per una determinata attività (p.e. la terapia endocrinologica, o la

microchirurgia delle vie seminali, o la fecondazione assistita);
 - il particolare interesse scientifico del Centro nei confronti di una patologia rispetto ad altre;

- differenze metodologiche nella esecuzione dell'esame ultrasonoro ed utilizzo di differenti apparecchiature.

Tabella 1	<i>Behre et al., 1995</i> (1048 pz.)	<i>Pierik et al., 1999</i> (1372 pz.)	<i>Colpi et al., 1997</i> (1113 pz.)
Varicocele	18,5%	29,7%	23,7%(44,6%)(1)
Anomalie epididimo (2)	19,2%	7,6%	54,9%
Idrocele	9,9%	3,2%	2,7%
Orchiopatia secretoria (3)	21,4%		19,4%
Microlitiasi testicolare		0,9%	2,3%
Ectasia rete testis/cisti testicolari	1,1%	0,7%	2,8%
Tumori testicolari	0,5%	0,5%	0,18% (1%)(4)

(1) *La percentuale si riferisce ai casi con varicocele franco (varici con diametro ≥ 3 mm e presenza di reflusso venoso spontaneo). La percentuale tra parentesi comprende anche i casi con varicocele sub-clinico (non palpabile, o con vene del diametro < 3 mm, o senza reflusso venoso spontaneo), la cui correzione chirurgica non è universalmente considerata utile.*

(2) *Nelle anomalie dell'epididimo sono compresi gli incrementi volumetrici dell'organo, le cisti e le anomalie dell'ecopattern: queste ultime rappresentano la quota maggiore delle anomalie riscontrate da Colpi et al. (1997).*

(3) *Con il termine orchiopatia secretoria si intendono tutte le alterazioni dell'ecopattern testicolare riconducibili ad un danno della spermatogenesi (Lenz et al., 1993)*

(4) *La percentuale tra parentesi si riferisce alla prevalenza di noduli intratesticolari di natura non maligna.*

Note di tecnica

Quando si esegue l'ES in un paziente infertile bisogna sapere innanzitutto cosa cercare. Se l'esecutore non ha ben chiara la fisiopatologia della riproduzione maschile è meglio che si astenga da tale attività, altrimenti rischia di fornire al clinico dei dati non corretti o incompleti. Questo può comportare conclusioni diagnostiche, prognostiche e terapeutiche errate, con gravi ripercussioni mediche, medico-legali ed etiche. In caso di responso ultrasonografico non convincente è meglio fidarsi dei soli dati anamnestici, palpatori e seminologici.

Prima di iniziare l'esame il medico deve chiedere al paziente informazioni sintetiche sulla sua storia clinica e seminologica ed eseguire una visita che appuri la sede, le

dimensioni e la consistenza dei testicoli, degli epididimi e dei dotti deferenti. Sono auspicabili anche una valutazione del varicocele in ortostatismo e l'ispezione di eventuali forme di ipermobilità gonadica.

L'indagine deve essere condotta con apparecchiature ad alta definizione, dotate di sonde ad alta frequenza. Nel nostro Centro di Infertilità utilizziamo apparecchiature Esaote AU4 e AU5 con sonde lineari da 7,5-10 MHz (per lo studio dell'epididimo sono disponibili anche sonde da 13 MHz). Lo strumento deve fornire un eccellente dettaglio sull'ecopattern epididimario (sede di frequenti anomalie della canalizzazione della via seminale) e della polpa testicolare (una polpa finemente disomogenea deve orientare verso una patologia secretoria).

Gli organi intrascrotali devono essere studiati sia in clino- che in ortostatismo, possibilmente in condizioni di astinenza sessuale standard. La nostra scuola esegue da sempre l'esame a poche ore di distanza dall'eiaculazione per l'esame seminale. In tal modo è possibile escludere che una dilatazione epididimaria sia da imputare ad una astinenza sessuale protratta, mentre l'iperafflusso sanguigno locale favorisce la documentazione di piccoli varicoceli. I testicoli, gli epididimi ed i funicoli devono essere valutati con scansioni longitudinali e trasversali.

IL TESTICOLO

Il volume testicolare può essere calcolato con la formula dell'ellissoide $[0,52 \times a \times b \times c]$ (dove a, b, c sono i tre diametri testicolari), sebbene le moderne apparecchiature possiedano il software necessario per calcolarlo automaticamente. Il volume gonadico di 600 maschi infertili consecutivi è risultato $14,7 \pm 4,5$ ml a destra e $13,8 \pm 4,2$ ml a sinistra (Negri, dati personali), cioè inferiore ai valori dei soggetti normali: infatti alcuni testi americani definiscono "atrophic" i testicoli di volume < 15 ml. Ciò a conferma della genesi prevalentemente testicolare di molte dispermie. "La ecostruttura del testicolo è caratterizzata da echi fini, addensati, disposti con grande omogeneità, la cui intensità è medio-alta...(Fig. 1). Ogni disomogeneità deve essere considerata anomala" (Menchini-Fabris et al., 1989).



Fig. 1: Testicolo normale con ecopattern omogeneo ad echi fini ed addensati ad intensità medio-alta

Testicoli interessati da orchiti batteriche o virali (Fig. 2), oppure orchipessati (Fig. 3), oppure con lesioni aspecifiche del tipo sclerosi tubulare o fibrosi interstiziale (Fig. 4) spesso presentano ecopattern finemente disomogeneo, con aree debolmente iperecoiche e di estensione variabile da gonade a gonade e da soggetto a soggetto (Einstein et al., 1992; Lenz et al., 1994).

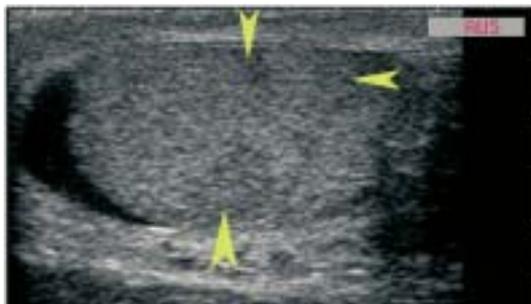


Fig. 2: Esiti di orchite virale. L'ecopattern appare disomogeneo con ampi settori iperecoici alternati a zone ipoecoiche (freccette).



Fig. 3: Testicolo orchipessato. L'ecopattern appare disomogeneo, con zolle ipoecoiche (si confronti con il testicolo normale della figura 1).



Fig. 4: Ecopattern disomogeneo in azoospermico (sclerosi tubulare).

Per contro i pazienti affetti da arresti maturativi puri della spermatogenesi hanno gonadi di aspetto ecografico normale.

Lenz et al. (1993) hanno proposto una classificazione dell'ecopattern testicolare basato su uno score da 1 a 5 (1: molto regolare; 2: lievemente irregolare; 3: irregolare con piccole aree di disomogeneità; 4: irregolare con ampie zone disomogenee; 5: irregolare con aree ben demarcate che fanno sospettare una neoplasia). Nella popolazione generale lo score mediano risulta pari a 2, mentre nella popolazione degli infertili è pari a 3 (*Lenz et al. 1994*).

Microlitiasi testicolare

La microlitiasi testicolare è una anomalia abbastanza rara caratterizzata dalla presenza di microcalcificazioni (0,5-2 mm di diametro) all'interno dei lumi dei tubuli seminiferi (*Weinberg et al., 1973; Nistal et al., 1979; Vegni-Talluri et al., 1980*). L'anomalo processo di calcificazione prenderebbe origine da cellule degenerate dell'epitelio seminifero attorno le quali si formerebbero strati concentrici di tessuto collagene (*Vegni-Talluri et al., 1980*).

La microlitiasi testicolare è stata descritta bilateralmente in giovani maschi criptorchidi o con ritardata discesa delle gonadi nello scroto (*Weinberg et al., 1973; Nistal et al., 1979; Vegni-Talluri et al., 1980; Mullins et al., 1986; Janzen et al., 1992*), in pazienti affetti da sindrome di Klinefelter (*Lanman et al., 1960*) o da microlitiasi alveolare del polmone (*Coetzee, 1970*). La stessa anomalia è stata di recente riscontrata anche in casi di seminoma testicolare (*Kragel et al., 1991; Janzen et al., 1992*). La microlitiasi testicolare è tuttavia osservabile anche in soggetti apparentemente sani, affetti da orchialgia (*Smith et al., 1991; Janzen et al., 1992*) o da dispermia (*Schantz & Milsten, 1976; Janzen et al., 1992*). In questi casi le lesioni non sembrano evolvere nel tempo.

In uno studio retrospettivo, *Hobarth et al. (1992)* hanno trovato una prevalenza della microlitiasi testicolare pari allo 0,6% (11 casi su 1710 ecografie testicolari). Lo stesso

ricercatore ha descritto successivamente 16 casi di microlitiasi testicolare (1993), sei dei quali erano associati a tumore testicolare (44%). La prevalenza di microlitiasi testicolare sembra essere maggiore nella popolazione infertile; *Colpi et al. (1997)* hanno documentato 25 casi di microlitiasi su 1113 pazienti infertili consecutivi (2,3%).

Sotto il profilo ecografico il parenchima testicolare presenta minuscoli foci iperecoici privi di cono d'ombra (l'esiguità delle lesioni non è in grado di attenuare il fascio di ultrasuoni). La densità di tali foci appare molto variabile all'interno del parenchima, passando da poche decine (Fig. 5) fino a un migliaio (Fig. 6).



Fig. 5: Microlitiasi testicolare di lieve entità. Nella porzione craniale del testicolo (a sinistra nell'immagine) si osservano poche decine di minuscoli spots iperecoici, privi di cono d'ombra.

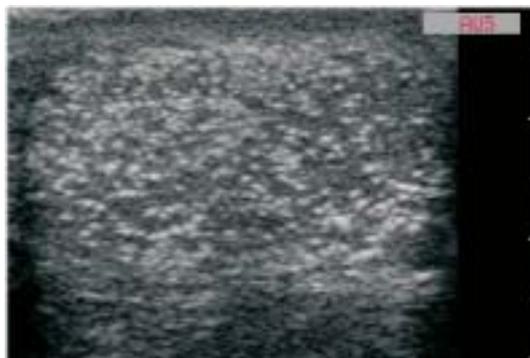


Fig. 6: Severa microlitiasi testicolare. Il parenchima testicolare è in larga parte occupato da spots iperecoici ("snow-storm testis"). Paziente infertile con oligoasteno-teratozoospermia ingravescente.

Questi ultimi casi, definiti da *Roberts & Loughran (1993)* “testicoli a tempesta di neve” sono spesso associati a neoplasia testicolare. Nella nostra casistica relativa a 1113 pazienti infertili, i casi di “testicoli a tempesta di neve” sono stati quattro. La biopsia testicolare estemporanea ha diagnosticato un carcinoma embrionario bilaterale in un paziente sottoposto altrove a varicoceleotomia per dispermia 3 mesi prima. Il paziente non aveva ovviamente effettuato in precedenza l’ecocolordoppler scrotale. All’esame obiettivo le gonadi erano di volume normale ma di consistenza ridotta e non si apprezzavano noduli. All’anamnesi familiare emergeva che il fratello era deceduto alcuni anni prima per lo stesso tipo di tumore. Nei restanti tre pazienti la biopsia testicolare non ha documentato neoplasia. I markers neoplastici ed il controllo ecografico sono allo stato attuale negativi.

La microlitiasi testicolare deve essere distinta da altri tipi di aree testicolari iperecoiche: calcificazioni di granulomi, di ematomi o di tumori (*Grantham et al., 1985; Martin & Tubiana, 1988; Nashan et al., 1990; Comiter et al., 1996; Kayada et al., 1996*)(Figg. 7, 8).

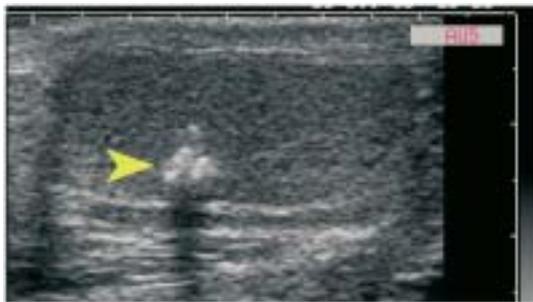


Fig. 7: Una calcificazione isolata del testicolo destro, non palpabile, indicata dalla freccia. Orchidometria ridotta, oligo-asteno-teratozoospermia severa. Il paziente nega traumi o altre patologie scrotali. Follow-up a 3 anni: invariato.

In questi casi di norma l’area risulta solitaria e di dimensioni maggiori. Anche l’anamnesi e la palpazione (piccoli noduli intratesticolari o irregolarità dell’albuginea) aiutano nella diagnosi differenziale.



Fig. 8: Una grossa calcificazione con fascio di attenuazione all’interno del testicolo, indicata dalla freccia. Esiti di ematoma traumatico inveterato.

Lesioni occulte del testicolo

L’ esecuzione routinaria della ES su maschi infertili consente non raramente di osservare noduli ben demarcati nel testicolo, non apprezzabili alla palpazione e che fanno sospettare una patologia neoplastica. Tali lesioni possono essere singole o multiple, localizzate nella parte centrale o periferica della gonade e a volte sembrano interessare sia il testicolo che l’epididimo. In alcuni casi si osserva una abbondante vascolarizzazione peri- ed intralesionale; in altri casi anche il power-doppler non evidenzia alcun flusso arterioso iuxta-lesionale. Sotto il profilo ecostrutturale tali lesioni possono presentarsi come aree ipoecoiche omogenee, molto ben definibili rispetto al parenchima sano circostante (Fig. 9), sebbene i margini possano a volte risultare irregolari, sfumati e senza un ben definito piano di clivaggio. Le loro dimensioni variano da pochi millimetri fino ad un centimetro.

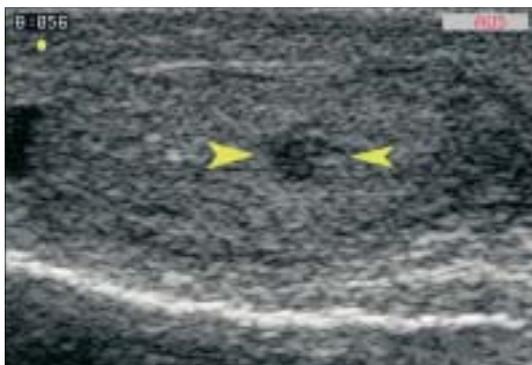


Fig.9 : Nodulo ipoecoico intratesticolare a margini irregolari. Esame istologico : area di atrofia.

Altre volte tali aree presentano un ecopattern disomogeneo (iper-ipo-anecoico) e l'esame istologico documenta fenomeni di necrosi, emorragia o calcificazioni (Fig. 10).

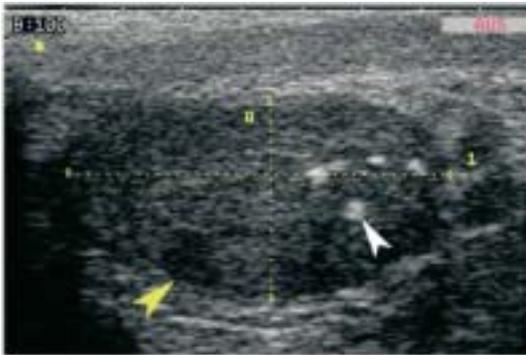


Fig. 10: Esiti di trauma testicolare bilaterale in paziente divenuto azoospermico. L'ecopattern testicolare risulta gravemente alterato, con aree ipo-anecoiche (freccia gialla) e calcificazioni (freccia bianca).

Esistendo un overlap ultrasonografico tra lesioni benigne e maligne (Einstein et al., 1992; Lenz, 1991), non sempre è possibile stabilire una precisa diagnosi con la ES. Pertanto qualunque anomalia ecografica nodulare del testicolo va considerata una potenziale neoplasia e va quindi gestita di conseguenza, specialmente quando la si osservi in testicoli orchipessati, o ipotrofici, o in pazienti nei quali sia nota una anomalia cromosomica (p.e. Sindrome di Klinefelter).



Fig. 11: Lesione ipo-anecoica intra-parenchimale (freccia gialla). Il power-doppler documenta una abbondante vascolarizzazione perilesionale (leydigioma monolaterale).

Nel nostro Centro ricorriamo di routine alla inguinoscopia esplorativa quando le lesioni ultrasonografiche risultano iper-vascolarizzate (Fig. 11) e/o palpabili, e l'anamnesi esclude traumi scrotali recenti.

Nelle lesioni di piccola taglia (non palpabili) senza una evidente ipervascolarizzazione locale al power-doppler si possono ragionevolmente controllare mensilmente i markers neoplastici testicolari e l'ES. L'eventuale positività dei markers e/o l'aumento volumetrico della lesione ecografica imporranno il ricorso alla inguinoscopia esplorativa. Come riportato nella tabella 1, il tasso di neoplasie maligne riscontrate occasionalmente nel corso di accertamenti risulta più elevato nella popolazione degli infertili (1/200), rispetto alla popolazione generale Europea (1/20.000) (Behre et al., 1995; Pierik et al., 1999). Nel nostro Centro il tasso risulta inferiore (~1/550); dei due casi di neoplasia occulta (non palpabile) da noi riscontrati su 1113 pazienti, uno era un seminoma tipico monolaterale (Fig. 12) mentre l'altro era un leydigioma monolaterale (Fig. 11).



Fig. 12: Un nodulo ipoecoico ben demarcato rispetto al parenchima circostante indicato dalle frecce bianche (a sinistra in scansione trasversale, a destra in scansione longitudinale). Esame istologico estemporaneo: seminoma tipico.

In altri 12 pazienti (1%) l'ES documentava lesioni sospette per neoplasia. Nessuna di queste è evoluta ad un follow-up a 24 mesi. Nei 4 casi sottoposti ad inguinoscopia esplorativa la diagnosi istologica ha documentato un nodulo di iperplasia leiomiomatosa epidid-

dimo-testicolare, una calcificazione di granuloma intratesticolare, un nodulo di sclerojalinosi testicolare (Figg. 13 e 14) e una cisti epidermica del testicolo (Figg. 15 e 16).

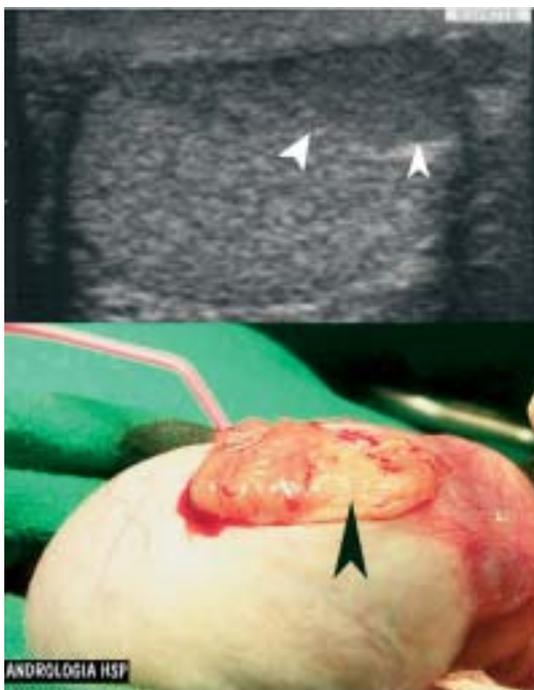


Fig. 13: Le frecce bianche indicano una vasta area omogeneamente ipoecoica delimitata da un orletto iperecoico nella porzione caudale della gonade, in prossimità della coda dell'epididimo.

Fig. 14: Stesso caso (reperto intraoperatorio): l'area ipoecoica risulta essere tessuto sclerotico. Esame istologico estemporaneo: sclero-jalinosi gonadica.

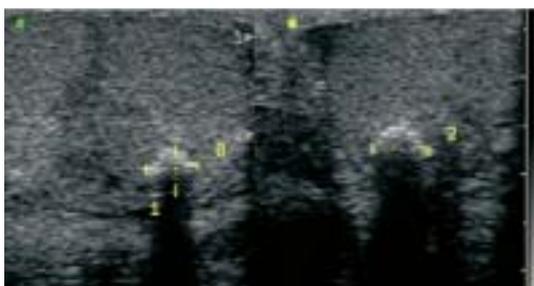


Fig. 15: Noduli iperecoici intratesticolari con cono d'ombra riscontrati in paziente affetto per dispermia associata a varicocele sinistro.



Fig. 16: Reperto intraoperatorio del caso illustrato nella fig. 15. Presenza di due formazioni biancastre di consistenza elevata, nettamente delimitate dal parenchima testicolare circostante. Diagnosi istologica estemporanea: cisti epidermoidi (lesione benigna).

L'EPIDIDIMO

L'epididimo risulta sempre valutabile nella porzione cefalica, la cui sezione longitudinale appare come un semicerchio con base adagiata sul polo superiore del testicolo (Fig. 17). In alcune sezioni può assumere forma vagamente triangolare.

Il diametro cranio-caudale nei soggetti fertili è pari a $9,2 \pm 2,8$ mm a destra e $9,3 \pm 3,0$ mm a sinistra (Negri et al., dati personali). Il corpo dell'epididimo non è sempre facilmente distinguibile e comunque la sua valutazione ha una minore rilevanza clinica. La quasi totalità delle patologie ostruttive o degenerative dell'epididimo colpiscono infatti la porzione craniale e la cauda. Inoltre, quando è interessato il corpus, lo sono per definizione anche il caput o la cauda e pertanto risulta sufficiente lo studio di queste due porzioni. La cauda epididymis (o meglio l'ansa epididimo-deferenziale) risulta facilmente indagabile (Fig. 18). A tale proposito bisogna evitare di confondere la coda con il caput quando è presente inversione verticale del testicolo, condizione quest'ultima responsabile di alterazioni spermatozoarie come la ridotta motilità (Bedford et al., 1994), la minore capacità di binding alla zona pellucida e di reazione acrosomiale (Lakoski et al., 1988), e la ritenzione di droplets citoplasmatici i cui enzimi sono stati messi in relazione con un danno da reazione perossidasi (Huszar & Vigue, 1994).

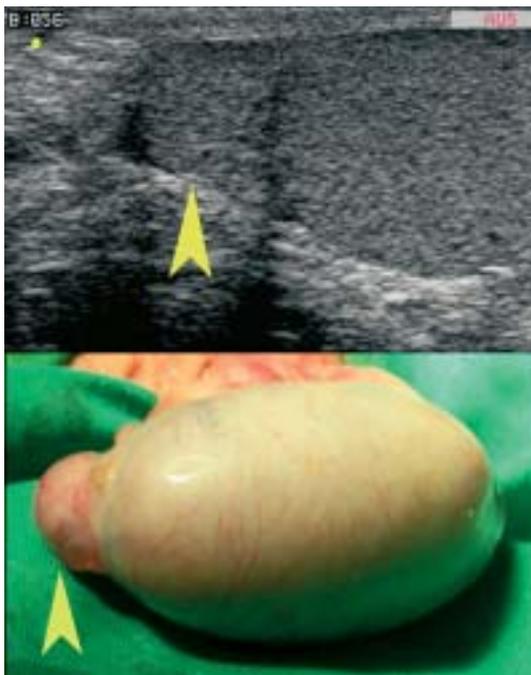


Fig. 17: Caput epididymis normale (frecce gialle) come appare in ecografia (sopra) e in sede intraoperatoria (sotto).

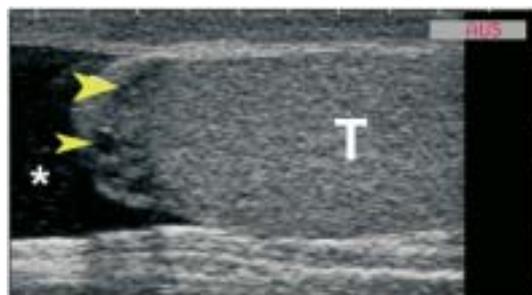


Fig. 19: Caput epididymis micropolicistico (le frecce gialle indicano alcune cisti). Una modesta falda di idrocele (area anecoica indicata dall'asterisco) è visibile nella parte sinistra della foto. T = testicolo.

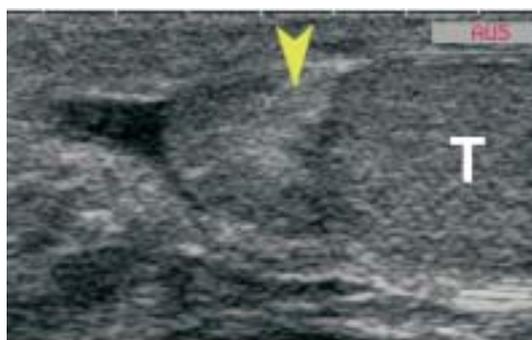


Fig. 20: Il caput epididymis appare dilatato ed il suo ecopattern risulta in buona parte iperecoico. T = testicolo.

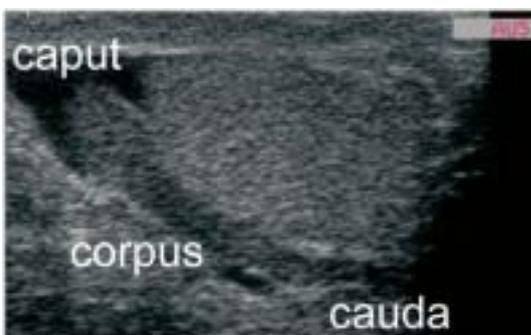


Fig. 18: Le tre porzioni dell'epididimo (in questo caso di aspetto normale) in una scansione longitudinale.

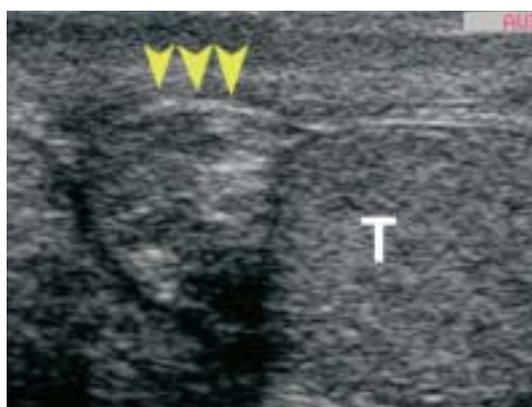


Fig. 21: Il caput epididymis (indicato dalle frecce) presenta ecopattern disomogeneo misto (presenza di aree ipo-anechoiche alternate ad aree iperecoiche). T = testicolo.

Il caput epididymis normale (ideale) mostra un ecopattern omogeneo, isoecoico rispetto a quello della gonade (Fig. 17). Con il termine ecopattern disomogeneo si intendono tutti quei quadri anomali caratterizzati dalla presenza di aree iper- e/o ipoecoiche, microcalcificazioni, cisti o microcisti (figg. 19-22).

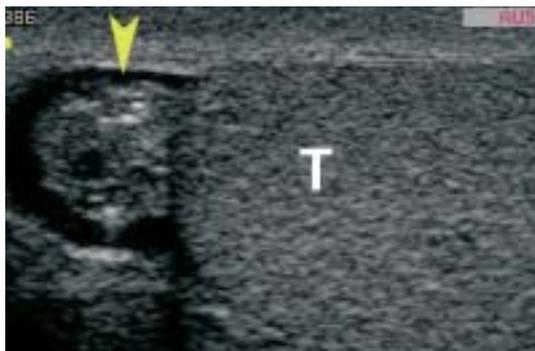


Fig. 22: Caput epididymis di piccole dimensioni (indicata dalla freccia) ma con ecopattern disomogeneo misto (presenza di microcisti alternate a spots iperecoici). T = testicolo.

Il caput epididymis è la sede più frequente di ostruzione o subostruzione (congenita o acquisita) (Dubin & Amelar, 1981; Hendry et al., 1983; Micic, 1987; Pryor, 1992) e non infrequentemente, insieme alla coda, tende a dilatarsi quando sia presente una ostruzione delle vie seminali a valle (dotto deferente o dotti eiaculatori). Un ecopattern disomogeneo del caput epididymis si associa frequentemente a processi di natura ostruttiva (Colpi et al., 1994) (Figg. 23-25) e pertanto lo studio ultrasonografico dell'organo va condotto con estrema precisione, ricorrendo a molteplici scansioni longitudinali e trasversali dell'organo.

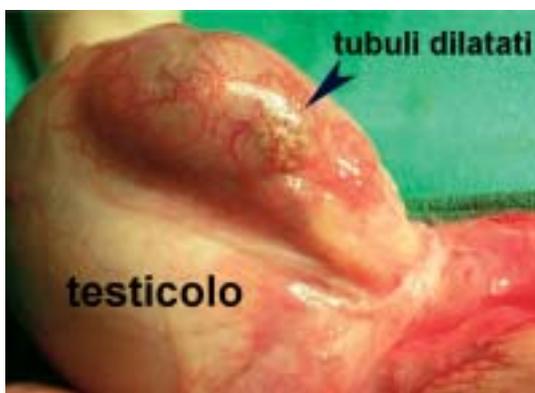


Fig. 23: Quadro intraoperatorio di agenesia di corpus-cauda epididymis e del dotto deferente. Il caput epididymis (freccia) appare dilatato e in trasparenza si osservano tubuli dilatati e parenchima discromico.



Fig. 24: Quadro intraoperatorio di subostruzione del caput epididymis in paziente gravemente dispermico asintomatico. Anamnesi muta e biopsia testicolare normale. Le frecce indicano aree di discromia epididimaria (esame istologico: depositi di pigmento simil-lipofuscino, infiltrato di macrofagi, tubuli epididimari incarcerati da sclerojalinosi interstiziale).



Fig. 25: Il caput epididymis (indicato dalle frecce) appare dilatato, di colorito bruno-verdastro. Paziente affetto da azoospermia associata ad ipoposia. Biopsia testicolare normale; presenza di numerosi spermatozoi nei dotti deferenti a valle degli epididimi. Normale pervietà dei dotti eiaculatori durante lavaggio anterogrado delle vie seminali distali. Conclusioni: stasi epididimaria secondaria ad alterato svuotamento delle vie seminali distali su base funzionale.

L'ILO TESTICOLARE E LA RETE TESTIS

L'ilo risulta sempre visibile come una banda iperriflettente disposta lungo l'asse maggiore del testicolo, in prossimità del margine posteriore (Fig. 26). L'ilo (o mediastino) testicolare è formato da tessuto connettivo, vasi sanguigni, nervi e dotti seminali intratesticolari (rete testis, tubuli efferenti). In alcuni soggetti appare di dimensioni modeste, in altri appare molto sviluppato; raramente capita di osservare piccole calcificazioni al suo interno. Non è ancora stato chiarito se questa variabilità morfologica sia da ricondurre a specifiche patologie.

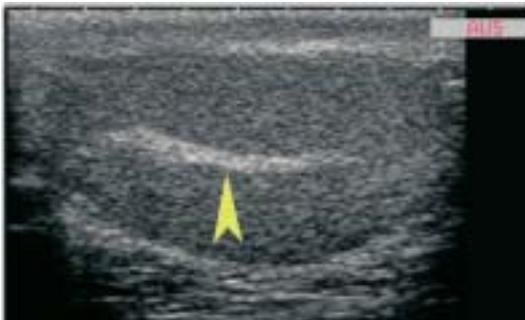


Fig. 26: L'ilo testicolare (indicato dalla freccia) appare come una banda iperriflettente disposta lungo l'asse maggiore del testicolo.

La più comune anomalia dell'ilo testicolare è sicuramente l'ectasia della rete testis. Essa consiste in una dilatazione abnorme dei tubuli che formano la rete testis ed è osservabile anche in alcuni mammiferi (Gelberg & McEntee, 1983).



Fig. 27: I tubuli ectasici della rete testis (indicati dalle frecce) appaiono come strutture anecoiche con orletto iperecoico.

Sotto il profilo ecografico si presenta come un insieme più o meno ampio di strutture tubulari od ovalari anecoiche, dotate di orletto iperecoico (Fig. 27) (Tejada & Eble, 1988; Hamm et al., 1988).

Per evitare di confondere l'ectasia della rete testis con vasi sanguigni del mediastino (in particolare le vene dilatate nei portatori di voluminosi varicoceci), è necessaria una accurata valutazione power-doppler della lesione, tenendo il testicolo ben fermo con la mano sinistra (eventualmente con l'aiuto di un secondo medico)(Fig. 28).



Fig. 28: La sola ecografia (a sinistra) evidenzia aree anecoiche all'interno dell'ilo testicolare. Utilizzando la funzione power-doppler e facendo eseguire la manovra di Valsalva si può documentare che le suddette aree non sono da imputare ad ectasia della rete testis ma a grosse vene intrailari. Tale quadro si osserva frequentemente nei pazienti con voluminoso varicocele. Il varicocele ilare può causare infertilità attraverso un meccanismo di compressione estrinseca sui tubuli retti ed efferenti (ostruzione della vie seminali intratesticolari da varicocele) (Nistal et al., 1984).

La rete testis è posta tra i tubuli retti (prossimalmente) e i tubuli efferenti (distalmente). Questi ultimi, di regola in numero compreso tra 8 e 14, escono dal testicolo formando il caput epididymis (de Fourmestreaux, 1981). Non è ancora stato definitivamente dimostrato se i tubuli che formano la rete testis siano o non siano tra loro anastomizzati. Secondo gli studi di Hunter i tubuli della rete testis sarebbero indipendenti uno dall'altro, e drenerebbero un ben distinto settore testicolare (Hirsch, 1995); secondo altri studi la rete testis sarebbe formata da tubuli ampiamente anastomizzati tra loro (da cui il termine "rete") con evidenti vantaggi in caso di ostru-

zione parziale di alcuni di loro (le anastomosi garantirebbero comunque lo svuotamento di tutti i settori del testicolo).

Le cause della ectasia possono essere congenite o acquisite. Nel primo gruppo rientrano le forme associate ad anomalie dell'apparato urinario (Nistal et al., 1984a), o ad agenesia del dotto deferente e del rene ipsilaterale (Charney & Gillenwater, 1965). Studi istologici (Leissring & Oppenheimer 1973) ricondurrebbero queste anomalie congenite della rete testis (derivante dal blastema gonadico) ad una sua difettosa congiunzione con i tubuli efferenti (questi ultimi derivanti dal dotto mesonefrico, come pure il tubulo epididimario e il dotto deferente). Le forme acquisite di ectasia della rete testis sono di norma secondarie ad ostruzioni post-traumatiche o post-flogistiche della via seminale a valle. Nistal et al. (1984b) hanno dimostrato che anche il varicocele intrailare può causare ectasia della rete testis. Di recente poi è stata ipotizzata una forma di ectasia della rete testis su base funzionale (Nistal & Jimenez-Heffernan, 1997) in soggetti criptorchidi.

La prevalenza di ectasia della rete testis nella popolazione generale è pari al 1,6% (dati ricavati da 1798 autopsie e 518 pezzi chirurgici) (Nistal et al., 1996).

La maggior parte dei casi finora descritti con l'ausilio della ES sono stati riscontrati in soggetti anziani portatori di spermatocele o di cisti epididimaria (Fig. 29).

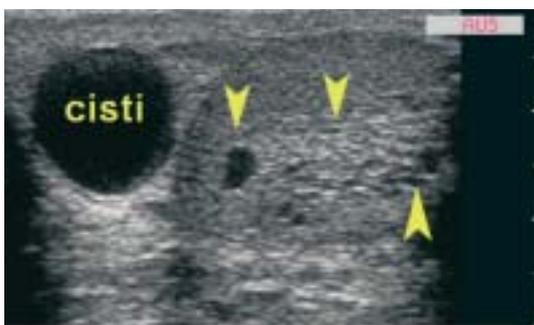


Fig. 29: Ectasia della rete testis (indicata dalle frecce) in soggetto portatore di cisti epididimaria. Paziente gravemente dispermico di 57 anni, già fertile in precedente matrimonio.

Nei soggetti di età inferiori ai 40 anni, l'ectasia della rete testis si associava spesso a orchialgia. In soli due casi l'anomalia è stata descritta in soggetti infertili (Brown et al., 1992; Weingarten et al., 1992).

Da una ricerca in corso presso il nostro Centro sembra emergere che la prevalenza della ectasia della rete testis sia cinque volte più elevata nella popolazione infertile rispetto a quella generale, e che essa si associ spesso ad azoospermia ostruttiva. In particolare è stata documentata in pazienti con biopsia testicolare normale ed assenza di spermatozoi nei tubuli epididimari durante tentativi falliti di ricanalizzazione microchirurgica. Pertanto l'osservazione di una ectasia della rete testis in un paziente candidato alla ricanalizzazione microchirurgica della via seminale potrebbe rappresentare un segno prognostico negativo.

IL VARICOCELE

“Varicocele is anatomically characterized by varices inside the scrotum; clinically by venous reflux; i.e. valvular insufficiency of the spermatic vein” (Ivanissevich & Gregorini, 1918).

Il reflusso nella vena spermatica interna e la conseguente dilatazione del plesso pampiniforme rappresentano quindi gli elementi indispensabili per poter emettere diagnosi di varicocele.

Il grado dell'ectasia si valuta con la palpazione:

- 1) III grado: è il varicocele già evidente alla ispezione;
- 2) II grado: è quello ben apprezzabile alla palpazione (ma non visibile);
- 3) I grado: è quello piccolo, dubbio, che sembra aumentare sotto manovra di Valsalva.

Il secondo elemento cardine del varicocele, vale a dire il reflusso venoso, si analizza con il doppler ad onda continua o preferibilmente con l'ecocolordoppler. Il reflusso venoso può essere:

- 1) Basale, rispettivamente continuo (Fig.30) o intermittente espiratorio in presenza di svalvolamento totale o sub-totale della vena spermatica interna.
- 2) Presente esclusivamente in corso di manovra di Valsalva (in condizioni basali non si registra alcun reflusso, ma la manovra evoca un reflusso protratto)(Fig. 31).
- 3) Assente o di brevissima durata in corso di manovra di Valsalva (Fig. 31).



Fig. 30: L'ecocolordoppler scrotale documenta un reflusso continuo ad alta velocità (13 cm/sec.).

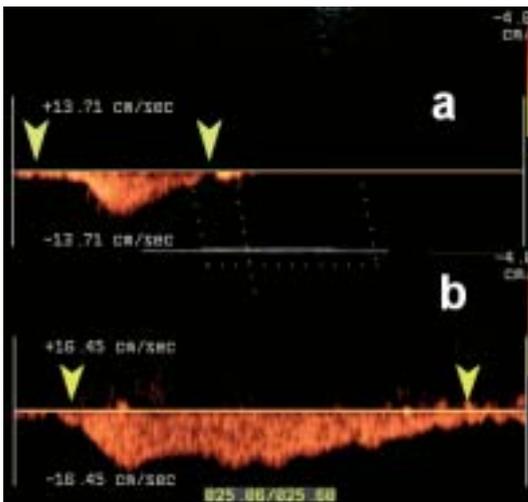


Fig. 31: I due traccati doppler (tra le frecce) indicano rispettivamente un reflusso di breve durata, inferiore a 1 secondo (figura a) ed un reflusso di maggiore entità, superiore a 2 secondi (figura b).

L'associazione delle tre classi palpatorie e delle tre classi flussimetriche danno origine a quadri con significato clinico differente.

a) Varicocele di II-III grado con reflusso basale: non vi sono dubbi circa l'esistenza della patologia.

Nella nostra esperienza su più di 2000 doppler-ecocolordoppler in pazienti infertili è assolutamente eccezionale il riscontro di varicocele di III grado senza reflusso basale (cioè il cosiddetto varicocele da stasi). Per contro tale riscontro non è infrequente nei soggetti anziani.

b) Varicocele di I grado oppure non palpabile, ma con reflusso basale (varicocele sub-clinico).

c) Varicocele di I-II grado con reflusso esclusivamente nel corso di manovra di Valsalva: non è assolutamente certo che sia un reperto patologico. La presenza di un reflusso solamente in corso di manovra di Valsalva può essere causata da un parziale svalvolamento della vena spermatica, oppure dall'esistenza di una sola valvola continente posta in sede molto craniale: il reflusso sotto Valsalva sarebbe provocato dall'accelerazione della colonna di sangue compresa tra la valvola continente ed il plesso pampiniforme. Ovviamente quanto più è posta caudalmente la valvola continente, tanto più breve sarà il reflusso venoso registrato in corso di manovra di Valsalva (Gall & Bähren, 1992).

d) Varici di I-II grado senza alcun reflusso basale e indotto, oppure di breve durata in corso di manovra di Valsalva: trattasi di un quadro fisiologico.

La nostra scuola da sempre propone la correzione del varicocele nel maschio dispermico quando sono presenti varicocele palpabile (II-III grado) e reflusso basale (continuo o intermittente). L'indicazione si basa ovviamente anche su molti altri elementi clinico-anamnestico-seminologici (p.e. durata dell'infertilità, età del paziente e della moglie, livelli di FSH, parametri seminali, volume delle gonadi, contemporanea presenza di flogosi o di ostruzioni delle vie seminali).

La correzione di un varicocele di I grado o subclinico, ma con reflusso basale, viene decisa caso per caso, sulla scorta dei sopra citati cofattori di dispermia. Questo approccio vale anche per i varicoceli di II-III grado senza reflusso venoso basale (reflusso evocabile solo in corso di manovra di Valsalva). Non correggiamo mai varicoceli di I-II grado senza reflusso venoso basale.

In associazione alla classificazione clinico-flussimetrica si può anche utilizzare quella morfologica B-mode, che valuta il numero, la sede ed il diametro delle vene intratesticolari (Figg. 32-33).

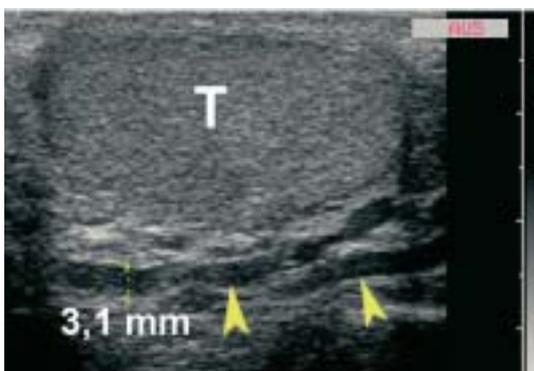


Fig. 32: Studio ecografico del varicocele. Le frecce indicano due varici del diametro > 3 mm. T = testicolo.



Fig. 33: Lo studio B-mode documenta un voluminoso varicocele. Le varici hanno un diametro > 5 mm ed alcune sono ben visibili anche all'interno del testicolo in sede ilare.

Alcuni Autori considerano sospetta per varicocele di interesse clinico l'osservazione ecografica di vene del diametro pari a 2 mm, sebbene attualmente l'orientamento sia quello di considerare predittivo un diametro maggiore o uguale a 3 mm in clinostatismo (Gonda et al., 1987; McClure et al., 1991; Geatti et al., 1991; Eskew et al., 1993; Hoekstra et al., 1995; Jarow et al., 1996; Sarteschi, 1998; Zini et al., 1998). Nella nostra personale esperienza un reflusso venoso basale spontaneo si osserva nel 77,3% dei casi con vene funicolari del diametro ≥ 3 mm in clinostatismo, e nel 42,1% dei casi con vene del diametro compreso tra 2 e 3 mm (Chi-square test: $p < 0.0001$).

Sotto il profilo tecnico l'ecocolordoppler scrotale deve essere eseguito con una apparecchiatura dotata di sonda ad alta definizione da 7-10 Mhz. L'indagine prevede innanzitutto la valutazione ecografica B-mode delle vene intrascrotali, con il paziente in posizione supina. L'esame morfologico consente di quantificare il numero, la sede (funicolare, posteriore, inferiore, intratesticolare) ed il diametro delle vene. Il paziente quindi si pone in ortostatismo. La sonda viene immediatamente posizionata sullo scroto con la funzione color-flow mapping già attiva. Ciò consente di apprezzare facilmente la presenza di attività venosa peritesticolare, distinguendo le forme caratterizzate da assente o da brevissimo reflusso indotto dal passaggio dal clino- all'ortostatismo, da quelle in cui si rileva un importante reflusso venoso che cessa dopo pochi secondi, ed ancora da quelle in cui il reflusso basale si mantiene costante. In quest'ultimo caso si procede ad inserire la funzione doppler pulsato che consente di determinare il carattere venoso e la velocità del reflusso continuo (1-3 cm/sec. = bassa velocità; 4-6 cm/sec. = media velocità; >6 cm/sec. = alta velocità). In assenza di segnale spontaneo si inserisce la funzione power-doppler che consente di intercettare reflussi anche a bassissima velocità (Fig. 34), ricorrendo anche ad artifici, come far parlare ad alta voce o respirare profondamente il paziente durante l'esame.

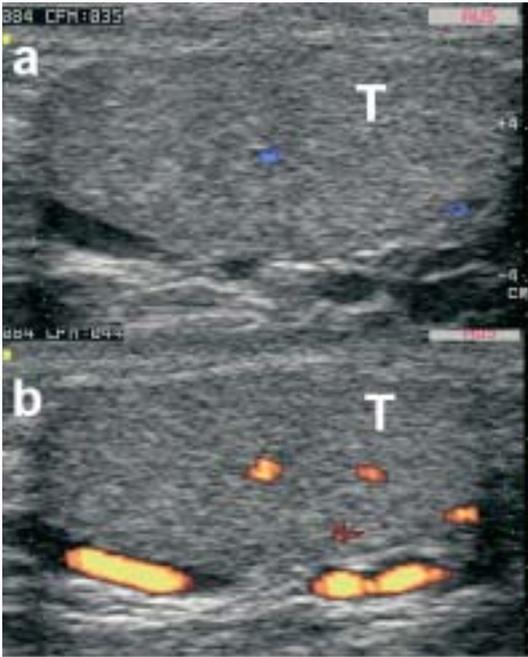


Fig. 34: Il color-flow mapping (a) non documenta reflusso venoso spontaneo nelle vene peritesticolari. Inserendo la funzione power (b) diventa ben evidente un reflusso venoso a bassissima velocità. T = testicolo

Si procede quindi ad esaminare la vena spermatica lungo il suo decorso nel canale inguinale (Fig. 35).



Fig. 35: Sulla vena spermatica interna nel canale inguinale (in blu) viene posizionato il volume campione per registrarne la velocità del reflusso (tracciato arancione).

Per agevolare il riconoscimento si ricorre alla spremitura-rilasciamento del plesso pampiniforme (Fig. 36). Quest'ultima manovra, oltre che facilitare la determinazione della direzione del flusso (centrifugo o centripeto), consente di evidenziare eventuali tronchi collaterali della vena spermatica. In assenza di reflusso basale, continuo o intermittente respiratorio, si può eseguire la prova di spremitura-rilasciamento del plesso pampiniforme, registrandone l'effetto emodinamico nella vena spermatica al canale inguinale. La spremitura induce un breve picco centripeto (convenzionalmente positivo) seguito, durante il rilasciamento, da un

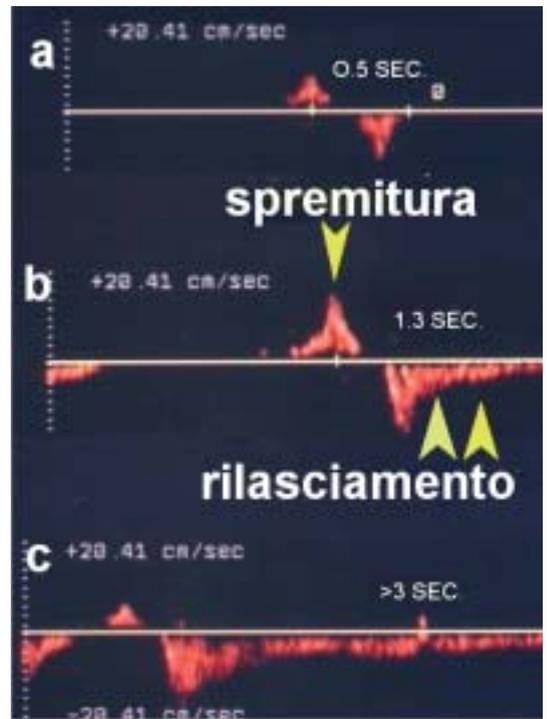


Fig. 36: Tre tracciati doppler ottenuti a livello della vena spermatica interna utilizzando la manovra di spremitura-rilasciamento del plesso pampiniforme. La freccia singola indica il flusso centripeto indotta dalla spremitura, mentre le due frecce indicano il reflusso venoso registrabile al momento del rilasciamento del plesso pampiniforme. La figura a mostra un reflusso di brevissima durata (0,5 secondi); la figura b un reflusso di 1,3 secondi, mentre la figura c un reflusso di lunga durata (>3 secondi). In quest'ultimo caso bisogna sospettare la presenza di un letto venoso molto ampio con incontinenza venosa parziale.

secondo picco centrifugo (convenzionalmente negativo). La durata di quest'ultimo è strettamente correlata alle dimensioni del letto venoso spermatico ed ancora alla distanza tra il plesso pampiniforme e la valvola posta più caudalmente nella vena spermatica interna. Quanto più l'ectasia venosa è importante e quanto più la valvola venosa è distante dal plesso (o risulta parzialmente incontinente), tanto più il reflusso registrato durante la fase di rilasciamento sarà lungo. Anche la nostra scuola considera un reflusso >1,6 secondi come sospetto di una disfunzione emodinamica venosa spermatica (*Annoni et al., 1987*).

L'esame viene completato con la manovra di compressione inguinale (la compressione della vena spermatica interrompe il reflusso nel plesso pampiniforme) e con la manovra di compressione-rilasciamento della safena per valutare possibili shunts tra il circolo venoso dell'arto inferiore e quello del testicolo.

Sempre in assenza di reflusso basale, continuo o intermittente espiratorio, si possono eseguire (o fare eseguire al paziente) manovre atte ad indurre reflusso nella vena spermatica. Tra queste la più nota è quella di Valsalva. Circa il significato del reflusso registrabile nel corso di tale manovra si è già detto sopra. Si tenga presente che un reflusso più o meno prolungato è presente durante la manovra di Valsalva nell'80% dei maschi (*Hirsh et al., 1980*), e pertanto esso non può genericamente essere considerato patognomonico di svalvolamento venoso. La presenza di un ingente reflusso venoso esclusivamente in corso di tale manovra (>2 secondi)(*Sarteschi, 1998*) deve spingere il medico ad un'attentissima ricerca di eventuali reflussi spontanei a bassa velocità (per esempio facendo parlare il paziente, o ricontrollando l'esame dopo avergli fatto fare esercizi fisici). La comparsa anche di un modesto reflusso basale deve orientare verso una diagnosi di svalvolamento parziale della vena spermatica.

La maggioranza delle indagini colordoppler o doppler effettuate altrove dai pazienti che giungono poi al nostro Centro di Infertilità documentano la presenza di un varicocele sulla base di un reflusso in corso di manovra di Valsalva. Molto raramente nel referto allegato si segnala la presenza di reflusso venoso basale (continuo o intermittente) e si dichiara l'entità di tale reflusso. Nella maggior parte dei pazienti che vengono da noi ricontrollati con l'ecocolordoppler possiamo tuttavia documentare un reflusso venoso basale. La spiegazione più plausibile è che le apparecchiature utilizzate altrove non siano correttamente "settate" per lo studio di flussi venosi a bassa velocità e che pertanto siano in grado di intercettare solamente flussi ad alta velocità come avviene in corso di manovra di Valsalva.

Il varicocele destro è spesso di piccole dimensioni e quasi sempre associato a voluminoso varicocele sinistro. Per potere emettere diagnosi di varicocele destro è indispensabile valutare le caratteristiche del flusso venoso nella vena spermatica lungo il canale inguinale. Un flusso centripeto spontaneo (spesso di tipo intermittente inspiratorio) è presente quando l'albero venoso di destra drena sangue dal sistema venoso di sinistra diventato incompetente. In questi casi l'ectasia venosa di destra scompare dopo la correzione del varicocele sinistro. Per contro, la presenza di flusso centrifugo spontaneo indica un vero reflusso spermatico destro. Nella nostra casistica quest'ultima evenienza è tuttavia rarissima (circa 1 caso su 200 con varicocele sinistro). Nella maggior parte dei casi a destra riscontriamo solamente reflussi sotto manovra di Valsalva. Contrariamente a quanto proposto da alcuni ricercatori (*Amelar & Dubin, 1987*), nel nostro Centro non correggiamo di norma i piccoli varicoceili di destra, visti gli scadenti risultati ottenibili (*Gall & Bähren, 1994 ; Grasso et al., 1995*).

Tutte le classificazioni proposte per la diagnosi di varicocele hanno un valore scientifico non solo quando hanno una buona sensibilità e specificità rispetto ad indagini di riferimento (flebografia retrograda), ma soprattutto quando garantiscono elevati tassi di successo in termini di miglioramento

seminale e di concepimenti naturali negli operati rispetto ai non operati.

Quali sono i risultati in termini di miglioramento seminale utilizzando il nostro criterio di selezione flussimetrica?

152 maschi infertili gravemente dispermici (età: $33,3 \pm 5,3$ anni) sono stati valutati dopo correzione di varicocele sinistro. Tutti i pazienti presentavano un numero totale di spermatozoi dotati di motilità progressiva $<5 \times 10^6/\text{ejacolato}$ (tipo "a+b", WHO, 1992) e un reflusso venoso basale (continuo o intermittente espiratorio) al plesso pampiniforme e alla vena spermatica interna nel canale inguinale. Tutti i pazienti avevano effettuato almeno 2 spermigrammi preoperatori e 2 postoperatori sec. W.H.O. (1992) presso il nostro Centro, e nessuno aveva effettuato altri trattamenti nel corso del follow-up. L'unico criterio di esclusione dallo studio è stato la presenza di anomalie cromosomiche.

A distanza di 6 mesi dalla correzione del varicocele il numero totale di spermatozoi con motilità progressiva è passato da $1,3 \pm 1,4 \times 10^6/\text{ejacolato}$ a $10,7 \pm 19,0 \times 10^6/\text{ejacolato}$ (Wilkoxon paired test: $p < 0.0001$). La percentuale di forme normali è passata da $19,4\% \pm 11,0\%$ a $21,1\% \pm 10,8\%$ (Wilkoxon paired test: $p = 0.02$).

In questi pazienti le conseguenze cliniche derivanti dalla correzione del varicocele sono risultate più interessanti dei puri dati statistici.

A) Dei 34 casi ove mancava totalmente la motilità progressiva, 6 hanno normalizzato il loro spermigramma sec. WHO (1992), 5 sono arrivati ad essere lievemente astenozoospermici, mentre in altri 7 il seme risultava idoneo all'esecuzione di inseminazioni intrauterine.

B) Dei 49 pazienti con $<1 \times 10^6$ spermatozoi mobili progressivi/ejacolato, 5 hanno normalizzato il loro spermigramma, 5 sono arrivati ad essere lievemente astenozoospermici, 19 hanno ottenuto un seme idoneo all'esecuzione di inseminazioni intrauterine, mentre 5 hanno quadruplicato i loro valori di partenza.

C) Dei 69 soggetti con $1-5 \times 10^6$ spermatozoi mobili progressivi/ejacolato, 29 hanno normalizzato il loro spermigramma e 9 sono arrivati ad essere lievemente astenozoospermici.

Riepilogo: in 40 pazienti lo spermigramma si è normalizzato, 19 sono passati ad una condizione di fertilità possibile (lieve astenozoospermia) e 26 ad una condizione che consentiva inseminazioni intrauterine, ed infine 5 soggetti con $<1 \times 10^6$ spermatozoi mobili progressivi/ejacolato hanno quadruplicato i valori di partenza.

Conclusioni: la correzione di un reflusso venoso spermatico basale in soggetti gravemente dispermici (in larga parte altrimenti candidabili alla sola ICSI) ha comportato un miglioramento seminale " clinicamente utile " in 90 pazienti su 152 (59,2%), indipendentemente dalle dimensioni del varicocele, dall'età dei pazienti e dalla presenza di altri co-fattori di dispermia.

Si può ragionevolmente ipotizzare che la percentuale di miglioramenti seminali " clinicamente utili " risulti ancora maggiore in soggetti infertili con dispermie un po' meno severe.

(Negri, Colpi et al., 1998)

BIBLIOGRAFIA

Amelar RD & Dubin L.

Right varicocelectomy in selected infertile patients who have failed to improve after previous left varicocelectomy. *Fertil Steril* 47: 833-837, 1987.

Annoni F, Colpi GM, Marincola FM, Negri L.

Doppler examination in varicocele: a standard method of evaluation. *J Androl* 9: 248-252, 1988.

Bedford JM.

The status and the state of the human epididymis.

Hum Reprod Update 9:2187-2199, 1994.

Behre HM, Kliesch S, Schädel F, Nieschlag E.

Clinical relevance of scrotal and transrectal ultrasonography in andrological patients. *Int J Androl* 18 (suppl. 2):27-31, 1995.

Brown DL, Benson CB, Doherty FJ, Doubilet PM, DiSalvo DN, Van Alstyne GA, Vickers MA, Loughlin KR.

Cystic testicular mass caused by dilated rete testis: sonographic findings in 31 cases. *AJR* 158:1257-1259, 1992.

Charney CW & Gillenwater JY.

Congenital absence of the vas deferens. *J Urol* 93:399-401, 1965.

Coetzee T.

Pulmonary alveolar microlithiasis with involvement of the sympathetic nervous system and gonads. *Thorax* 25:637-639, 1970.

Colpi GM, Negri L, Scropo F, Grugnetti C.

Epididymal ultrasonographic findings in case of obstructive pathology.

Acta Chir Hungarica 34:299-302, 1994.

Colpi GM, Negri L, Scropo F, Grugnetti C.

Genital ultrasonography in male infertility. Presented at 6th International Meeting of the "European Association for Genital Microsurgery", Lisboa, November 21-23, 1997.

Comiter CV, Renshaw AA, Benson CB, Loughlin KR.

Burned-out primary testicular cancer: sono-

graphic and pathological characteristics. *J Urol* 156:85-88, 1996.

de Fourmestraux N, Gonzales J, Lesourd S, Fourcade R, Jardin A.

Obstruction of the epididymal extremities. In : *Epididymis and Fertility - Biology and Pathology.*

C. Bollack & A. Clavert (eds), Basel, Karger, pp 146-1153, 1981.

Dubin L & Amelar RD.

Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility.

Fertil Steril 22: 469-471, 1971.

Einstein DM, Paushter DM, Singer AA, Thomas AJ, Levin HS.

Fibrotic lesions of the testicle: sonographic patterns mimicking malignancy. *Urol Radiol* 14:205-210, 1992.

Eskew LA & Jarow JP.

Can ultrasonography advance the diagnosis of varicocele?

Contemp Urol, August:23-27, 1994.

Gall H & Bähren W.

Diagnosing clinical and subclinical varicocele: comparative investigations by doppler sonography and phlebography.

In: *Diagnosing Male Infertility - New Possibilities and Limits.*

GM Colpi & D Pozza (eds), Basel, Karger, pp. 144-1147, 1992.

Gall H & Bähren W.

Percutaneous sclerotherapy in subfertile patients with left-sided varicocele.

In: *Treating Male Infertility.*

GM Colpi & M Balerna (eds), Basel, Karger, pp. 114-123, 1994.

Geatti O, Gasparini D, Shapiro B.

A comparison of scintigraphy, thermography, ultrasound and phlebography in grading of clinical varicocele.

J Nucl Med 32:2092-2097, 1991.

Gelberg HB, McEntee K.

Cystic rete testis in a cat and fox.

Vet Pathol 20:634-636, 1983.

Gonda RL, Jr., Karo JJ, Forte RA, O'Donnell KT.

Diagnosis of subclinical varicocele in infertility.

AJR 148:71-75, 1987.

Grantham JG, Charboneau JW, James EM, Kirschling RJ, Kvols LK, Segura JW, Wold LE.

Testicular neoplasm: 29 tumors studied by high-resolution US.

Radiology 15:775-780, 1985.

Grasso M, Lania C, Castelli M, Galli L, Rigatti P.

Bilateral varicocele: impact of right spermatic vein ligation on fertility.

J Urol 153:1847-1848, 1995.

Hamm B, Fobbe F, Loy V.

Testicular cysts: differentiation with US and clinical findings.

Radiology 168:19-23, 1988.

Hamm B.

Sonography of the testis and epididymis.

Andrologia 26:193-210, 1994.

Hendry WF, Parslow JM, Stedronska J.

Exploratory scrototomy in 168 azoospermic males. Br J Urol 55: 785-791, 1983.

Hirsh A & Pryor JP.

The doppler assessment of varicocele.

In: Varicocele and Male Infertility II.

M Glezerman & EW Jeht (eds). Berlin, Springer-Verlag, pp. 55-59, 1984.

Hirsh AV.

The rete testis and efferent ducts in the

Glasgow Hunterian anatomical collection

In: The Embryo. N Colacurci & A Cardone (eds). Napoli, G. De Nicola, pp. 53-57, 1998.

Hobarth K, Susani M, Szabo N, Kratzik C.

Incidence of testicular microlithiasis.

Urology 40:464-467, 1992.

Hobarth K, Szabo N, Klingler HC, Kratzik C.

Sonographic appearance of testicular microlithiasis. Eur Urol 24:251-255, 1993.

Hoekstra T, Witt MA.

The correlation of internal spermatic vein palpability with ultrasonographic diameter and reversal of venous flow. J Urol 153:82-84, 1995.

Huszar G & Vigue L

Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. J Androl 15:71-77, 1994.

Ivanissevich O & Gregorini H

Una nueva operacion para curar el varicocele. Semana Medicin, Buenos Ayres, 25, 575, 1918

Janzen DL, Mathieson JR, Marsh JI, Cooperberg PL, del Rio P, Golding RH, Rifkin MD.

Testicular microlithiasis: sonographic and clinical features.

AJR 158:1057-1060, 1992.

Jarow JP, Ogle SR, Eskew LA.

Seminal improvement following repair of ultrasound detected subclinical varicoceles. J Urol 155:1287-1290, 1996.

Jequier AM, Crich JP, Holmes SC.

Incomplete obstruction of the male genital tract: a cause of oligozoospermia.

Br J Urol 55: 545-546, 1983.

Kayada K, Yamaguchi O, Irisawa C, Muraki O.

Burned-out tumor and carcinoma-in-situ of the testis mimicking an extragonadal germ cell tumor: a case report.

Hinyokika Kyo 42:613-616, 1996.

Kragel PJ, Delvecchio D, Orlando R, Garvin DF.

Ultrasonographic finding of testicular microlithiasis associated with intratubular germ cell neoplasia.

Urology 37:66-68, 1991.

Lakoski KA, Carron CP, Cabot CL, Saling PM.

Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M 42 antigen.

Biol Reprod 38:221-233, 1988.

Lanman JT, Sklarkin BS, Cooper HL.

Klinefelter's syndrome in a ten month old mongolian idiot: report of a case with chromosomal analysis.

N Engl J Med 263:887-892, 1960.

Leissring JC & Oppenheimer RO.

Cystic dysplasia of the testis: a unique congenital anomaly studied by microdissection. J Urol 110:362-363, 1973.

Lenz S.

Cancer of the testicle diagnosed by ultrasound and the ultrasonic appearance of the

contralateral testicle.

Scand J Urol Nephrol (Suppl) 137:135-138, 1991.

Lenz S, Giwercman A, Elsborg A, Cohr KH, Jelnes JE, Carlsen E, Skakkebaek NE.

Ultrasonic testicular texture and size in 444 men from the general population: correlation to semen quality.

Eur Urol 24:231-238, 1993

Lenz S, Thomsen JK, Giwercman A, Hertel NT, Hertz J, Skakkebaek NE.

Ultrasonic texture and volume of testicles in infertile men.

Hum Reprod 9:878-881, 1994.

Leung ML, Gooding GAW, Williams RD.

High-resolution sonography of scrotal contents in asymptomatic subjects.

AJR 143:161-164, 1984.

Martin B & Tubiana JM.

Significance of scrotal calcifications detected by sonography.

J Clin Ultrasound 16:545-552, 1988.

McClure RD, Khoo D, Jarvi K.

Subclinical varicocele: the effectiveness of varicocelectomy.

J Urol 145:789-791, 1991.

Menchini-Fabris GF, Carletti C, Paoli R, Sarteschi M.

Il Testicolo.

In: Testo-Atlante di Ecografia in Andrologia, Firenze, Rima, 1989.

Micic S.

Incidence of aetiological factors in testicular obstructive azoospermia.

Int J Androl 10: 681-684, 1987.

Mullins TL, Sant GR, Ucci AA, Doherty FJ.

Testicular microlithiasis occurring in a post-orchiopey testis.

Urology 27:144-147, 1986.

Nashan D, Behre HM, Grunert JH,

Nieschlag E.

Diagnostic value of scrotal sonography in infertile men: report on 658 cases.

Andrologia 22:387-395, 1990.

Negri L, Colpi GM, Scropo FI, Grugnetti C.

Changes of therapeutic strategies for inferti-

le males after varicocele surgery.

Int J Androl 21 (suppl. 1):25, 1998.

Nistal M, Paniagua R, Diez-Pardo JA.

Testicular microlithiasis in two children with bilateral cryptorchidism.

J Urol 121: 535-538, 1979.

Nistal M, Paniagua R, Regadera J.

Cystic dysplasia of the testis.

Arch Pathol Lab Med 108:579-583, 1984a.

Nistal M, Paniagua R, Regadera J, Santamaria L.

Obstruction of the tubuli recti and ductuli efferentes by dilated veins in the testes of men with varicocele and its possible role in causing atrophy of the seminiferous tubules.

Int J Androl 7:309-323, 1984b.

Nistal M, Mate A, Paniagua R.

Cystic transformation of the rete testis.

Am J Surg Pathol 20:1231-1239, 1996.

Nistal M, Jimenez-Heffernan JA.

Rete testis dysgenesis. A characteristic lesion of undescended testes.

Arch Pathol Lab Med 121:1259-1264, 1997.

Pierik FH, Dohle GR, van Muiswinkel JM, Vreeburg JT, Weber RF.

Is routine scrotal ultrasound advantageous in infertile men?

J Urol 162:1618-1620, 1999.

Pryor JP.

Indications for vasovesiculography and testicular biopsy. In: Diagnosing Male Infertility - New Possibilities and Limits. GM Colpi & D Pozza (eds), Karger, Basel, pp 130-135, 1992.

Rifkin MD, Kurtz AB, Goldberg BB.

Epididymis examined by ultrasound.

Radiology 151:187-190, 1984.

Roberts IS, Loughran CF.

Case report: the ultrasound appearances of testicular microlithiasis ('snow storm' testis): a case complicated by testicular seminoma. Clin Radiol 47: 65-67, 1993.

Sarteschi LM.

Mezzi diagnostici.

In: Consensus Conference sul Varicocele. C Trombetta, S Annoscia, A De Rose, G Piubello, A Natali (eds)

Trieste, Graphart, pp. 58-64, 1998.

Schantz A & Milsten R.

Testicular microlithiasis with sterility.
Fertil Steril 27:801-804, 1976.

**Smith WS, Brammer HM, Henry M,
Frazier H.**

Testicular microlithiasis: sonographic features with pathologic correlation
AJR 157:1003-1005, 1991.

Tejada E & Eble JN.

Simple cyst of the rete testis. J Urol
139:376-377, 1988.

**Vegni-Talluri M, Bigliardi E, Vanni MG,
Tota G**

Testicular microliths: their origin and structure. J Urol 124:105-111, 1980.

Watson LR & Older RA

Scrotal ultrasonography: technique and interpretation. Contemporary Urology,
October, 23-35, 1994.

Weinberg AG, Currarino G, Stone IC Jr.

Testicular microlithiasis. Arch Pathol
95:312-319, 1973.

W.H.O.

WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, New York, 1992.

Witt MA & Lipshultz LI

Varicocele: a progressive or static lesion?
Urology 42:541-543, 1993 .

**Zini A, Buckspan M, Berardinucci D,
Jarvi K**

Loss of left testicular volume in men with clinical left varicocele: correlation with grade of varicocele. Arch Androl 41:37-41, 1998.

ECOGRAFIA PROSTATO-VESCICOLARE TRANSRETTALE

Fabrizio Scroppo e Renzo Benaglia

Servizio di Andrologia, Ospedale San Paolo - Polo Universitario (Milano)

L'impiego sempre più frequente dell'ecografia prostatovesvicolare transrettale (TRUS) ha drasticamente ridotto l'uso della deferentovesiculografia (DVG) (Boreau, 1974) nella diagnosi dei disturbi dello svuotamento delle vie seminali distali (vescicole seminali, ampolle deferenziali, dotti eiaculatori, prostata, uretra prostatica). I motivi vanno ricondotti alla totale assenza di invasività della metodica, alla sua ripetibilità, ai bassi costi e alla sempre maggiore definizione delle apparecchiature disponibili.

Nella nostra esperienza l'applicazione routinaria della TRUS su ampie popolazioni di maschi infertili ha evidenziato una prevalenza di anomalie delle vie seminali distali (quindi di quadri potenzialmente ostruttivi) decisamente più elevata di quanto si pensasse fino a pochi decenni fa (tab. 1)(Colpi et al., 1997a). L'ecografia transrettale risulta quindi imprescindibile nella valutazione del maschio azoospermico o dispermico in cui si presenti il sospetto di una patologia ostruttiva.

Alterazioni dell'ecopattern della prostata	30,2%
Cisti mülleriane (diametro > 5 mm)	6,4%
Anomalie monolaterali dei dotti eiaculatori	20,0%
Anomalie bilaterali dei dotti eiaculatori	5,6%
Ectasia delle vescicole seminali (diametro trasverso >15 mm)	14,7%
Aree anecoiche nelle vescicole seminali	19,8%
Agenesia delle vescicole seminali	0,3%
Ipotrofia delle vescicole (diametro trasverso < 4mm)	0,6%

Tabella 1. Anomalie ecografiche delle vie seminali distali: prevalenza in 622 infertili consecutivi

INDICAZIONI ALL'ESECUZIONE DELLA TRUS NEL MASCHIO INFERTILE

L'esame è indicato quando all'anamnesi patologica prossima o remota il paziente infertile riferisce:

- episodi di emospermia
- eiaculazione dolorosa
- uretriti/prostatiti
- sintomi ostruttivi o irritativi delle vie urinarie
- promiscuità sessuale
- pregressi interventi sull'apparato urogenitale
- modificazioni quali-quantitative dell'eiaculato.

Ulteriori dati seminologici e clinici che impongono l'esecuzione della TRUS sono:

- Ipoposia
- Azoospermia od oligoastenoteratozoospermia severa
- Riduzione o assenza del fruttosio seminale

- Anomalie palpatorie prostatiche (formazioni cistiche mediane o paramediane)
- Anejaculazione, eiaculazione retrograda

NOTE DI TECNICA

Per una esecuzione corretta dell'esame è opportuno che il paziente effettui un enterocisma ed evacui poche ore prima dell'esame. E' altrettanto opportuno che il paziente eiaculi poco prima (migliore visualizzazione dei dotti eiaculatori in caso di loro ostruzione). La replezione vescicale non è importante, a meno che non si voglia anche studiare lo svuotamento vescicale.

Si invita quindi il paziente a posizionarsi in decubito laterale sinistro e a flettere leggermente le gambe e le cosce.

L'indagine deve essere condotta con una

sonda transrettale ad alta risoluzione, da 6,5-7,5 Mhz, possibilmente biplanare. L'esame inizia con lo studio della prostata, della quale vanno riportati:

- Dimensioni (e volume), morfologia e presenza di eventuale ipertrofia (non di rado già dalla 4^a decade di età si apprezzano quadri di iniziale ipertrofia con sollevamento del pavimento vescicale).
- Ecopattern della ghiandola prostatica (Figg. 1, 2). Grossolane disomogeneità ecostrutturali del parenchima (Fig. 3), come le calcificazioni singole o multiple (Figg. 4, 5) (Harada, 1981; Ludwig et al., 1994), eventualmente iuxta-montanali, oppure vaste zone debolmente ed omogeneamente iperecoiche (Figg. 6, 7) o ipoecoiche, devono fare



Fig. 1: Prostata normale in scansione trasversale. Le zone centrale e periferica appaiono più chiare rispetto alla zona di transizione (ZT), dato il maggiore numero di interfacce prodotte dalle pareti delle ghiandole (nella zona di transizione il rapporto stroma/tessuto ghiandolare è maggiore) (Villers et al., 1990).



Fig. 2: Prostata normale in scansione longitudinale.



Fig. 3: Prostata con aspetto grossolanamente disomogeneo (pregressa prostatite acuta cronicizzata).



Fig. 4: Aree fibrocalcifiche multiple intraprostatiche indicate dalle frecce (scansioni trasversali).



Fig. 5: Calcificazioni iuxta-ductali (freccia) della prostata (P). Asterisco (*)= dotto eiaculatore. VS= vescicola seminale.

sospettare nel paziente asintomatico una patologia flogistica cronica (tipo IV secondo New NIH Classification of the Prostatitis Syndrome) (Nickel, 1999) (Figg. 6, 7) o una possibile patologia subostruttiva dei dotti eiaculatori (Fig. 5). Nessun caso di neoplasia prostatica è stato

finora osservato nella nostra casistica sulla popolazione infertile (1988-2000).

- Vanno infine ricercate e documentate eventuali formazioni cistiche intraprostatiche mediane (residui del dotto di Müller)(Figg. 8, 9) o paramediane (residui del dotto di Wolff)(Figg 10, 11).



Fig. 6: Prostata con ampie aree debolmente ed omogeneamente iperecoiche indicate dalle frecce (scansioni trasversali). Paziente dispermico asintomatico; l'esame citologico a fresco del secreto prostatico evidenzia 90 leucociti per campo a 400 x e risulta pertanto flogistico.



Fig. 7: Stesso caso della figura 6 in scansione longitudinale. Le frecce indicano le zone debolmente ed omogeneamente iperecoiche tipiche della flogosi.

Si valutano poi le vescicole seminali e le ampolle deferenziali (Fig. 12), relativamente a:

- morfologia e contorni delle ghiandole che devono essere regolari (Figg. 12, 13) (margini irregolari o pseudodiverticolari e morfologia bozzuta o pseudocistica devono far sospettare una ostruzione dei dotti ejaculatori o una infezione) (Fig. 14)
- simmetria delle vescicole seminali (una



Fig. 8: Piccola cisti mülleriana indicata dalla freccia (scansione trasversale).



Fig. 9: Voluminosa cisti intraprostatica mediana in scansione trasversale (cisti mülleriana) indicata dalla freccia.



Fig. 10: Cisti vescicolare monolaterale (*) a sviluppo intra- ed extraprostatico (scansioni trasversali; a destra a livello più craniale). P= prostata. Soggetto affetto da ipoposia primitiva (volume ejacolato: 0,2 ml), pH seminale acido ed azoospermia. Il quadro seminale è da mettere in rapporto con una compressione estrinseca esercitata dalla cisti sul dotto ejacolatore controlaterale.

chiara asimmetria deve far sospettare una patologia ostruttiva monolaterale del dotto ejacolatore oppure una flogosi monolaterale



Fig. 11: Stesso caso illustrato nella fig. 10 (scansione longitudinale). Il volume della cisti è ragguardevole (200 ml circa).

della vescicola seminale) (Ludwig et al., 1994)
 • diametri longitudinale e antero-posteriore (il nostro gruppo valuta di routine il diametro antero-posteriore). Quest'ultimo nella popolazione normale in età fertile (361 controlli)



Fig. 12: Vescicola seminale e ampolla deferenziale normali in scansione longitudinale.

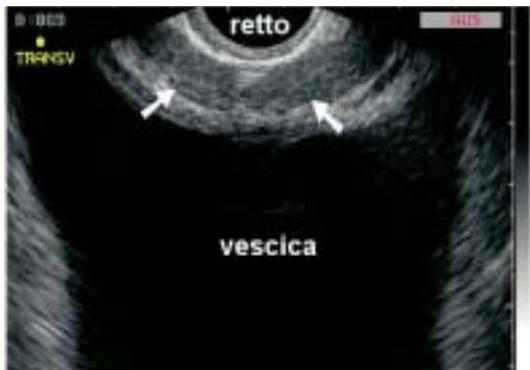


Fig. 13: Vescicole seminali simmetriche, di dimensioni normali e con ecopattem omogeneo normoeoico (frece) (scansione trasversale).

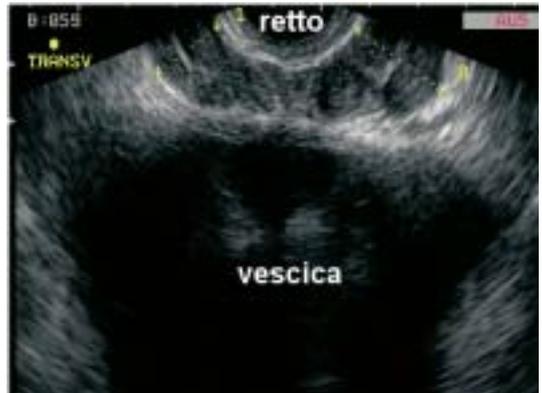


Fig. 14: Vescicole seminali (indicate dai calipers) di dimensioni aumentate e aspetto bozzuto, con ecopattem disomogeneo : vesciculite cronica asintomatica (scansione trasversale).

risulta pari a $9,4 \pm 2,3$ mm a destra e $9,3 \pm 2,4$ mm a sinistra (5° percentile: 6 mm bilateralmente; 95° percentile: 14 mm bilateralmente) (Figg. 15, 16)



Fig. 15: Vescicola seminale ipotrofica (indicata tra i calipers) (scansione longitudinale).



Fig. 16: Vescicola seminale ectasica. Immediatamente dopo l'eiaculazione il diametro antero-posteriore è pari a 19 mm. L'ecopattem appare omogeneo.



Fig. 17: Vescicole seminali ectasiche (indicate dai calipers), a margini irregolari e con numerose aree anecoiche rotondeggianti al loro interno, alcune delle quali sono indicate dalle frecce (“honeycomb areas”).



Fig. 20: Scansione trasversale di vescicole seminali con segni di sclerosi post-tubercolare (freccia).

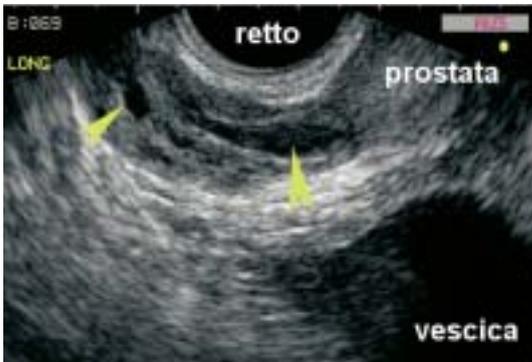


Fig. 18: Scansione longitudinale di vescicola seminale con aree anecoiche, alcune delle quali sono indicate dalle frecce.



Fig. 21: Formazioni litiasiche nella vescicola seminale (freccia a sinistra) e nel dotto eiaculatore (freccia a destra) (scansione longitudinale).

- ecopattern: deve essere omogeneo, isoecoico rispetto a quello prostatico. Aree ipo-aneecoiche a margini irregolari oppure di forma regolare rotonda od ovalare (le cosiddette



Fig. 19: Scansioni longitudinali in paziente affetto da agenesia dei dotti deferenti. A destra la vescicola seminale è ridotta ad un cordoncino di 2 mm di diametro antero-posteriore (freccia); a sinistra la vescicola manca completamente (freccia).



Fig. 22: Ostruzione completa della porzione terminale del dotto eiaculatore. Nella scansione longitudinale il tratto a monte dell'ostruzione appare molto dilatato ed anecoico.



Fig. 23: Ostruzione completa del dotto eiaculatore. Nelle scansioni longitudinali ad alto ingrandimento, effettuate immediatamente dopo eiaculazione, è possibile determinare con precisione il livello dell'ostruzione del dotto eiaculatore lungo il suo decorso intraprostatico (indicato dalle frecce).

- eventuale agenesia o atresia mono-bilaterale (spesso consensuale ad agenesie epididimo deferenziali) (Fig. 19)
- eventuale sclerosi post-flogistica (spesso tubercolare) (Fig. 20)
- eventuali formazioni litiasiche intravescicolari (Fig. 21).

Infine vanno studiati i dotti eiaculatori che usualmente non appaiono visibili. In presenza di processi (sub-)ostruttivi i dotti risultano per contro ben visibili. Quando l'ostruzione è situata nel tratto distale, essi possono apparire dilatati ed anecoici lungo tutto il loro decorso (Fig. 22), mentre se la ostruzione è più prossimale il tratto ectasi-



Fig. 24: Il dotto eiaculatore appare anecoico e ben visibile lungo il suo decorso intraprostatico. Si noti l'ispessimento iperecoico dei tessuti periduttali (frecce).



Fig. 26: Il dotto eiaculatore è completamente ostruito ed appare molto dilatato nel suo tratto prossimale (freccia bianca). Al suo interno è visibile un piccolo calcolo (freccia gialla).



Fig. 25: Esiti di flogosi prostatico-vescicolare. Il dotto eiaculatore ostruito (frecce) appare incarcerato dentro una zona di sclerosi.



Fig. 27: Ostruzione parziale del dotto eiaculatore (freccia a destra) che comporta modesta ectasia del tratto preduttale (frecce contrapposte a sinistra), al cui interno sono presenti detriti iper-riflettenti.

co risulterà più breve (Fig. 23). Tali immagini possono essere documentate efficacemente solo dopo aver fatto ejaculare il paziente e, in casi selezionati, è possibile misurare la distanza tra la sede dell'ostruzione e lo sbocco del dotto al veru montanum. Spesso queste forme ostruttive sono post-flogistiche e si associano a ispessimento iperecoico periduttale (Figg. 24, 25). Talvolta è possibile riscontrare formazioni litiasiche all'interno dei dotti (Figg. 26, 27).

PATOLOGIA OSTRUTTIVA DELLE VIE SEMINALI DISTALI: CLASSIFICAZIONE ECOGRAFICA

Le anomalie ostruttive delle vie seminali distali possono essere classificate in differenti modi. Si distinguono anomalie congenite o acquisite, a loro volta bilaterali o monolaterali. Tali anomalie possono essere anatomiche o funzionali (Colpi et al., 1987).

1) Anomalie anatomiche congenite

Le anomalie anatomiche congenite sono di norma caratterizzate dalla presenza di cisti al carrefour uroseminale. Le cisti possono essere di origine wolffiana (Littrup et al., 1988), mülleriana (Gil Vernet, 1953; Schuhrke & Kaplan, 1978) e del seno urogenitale (Elder & Mostwin, 1984; Mayersak, 1989). Queste ultime due si presentano sotto



Fig. 28: Deferentovesiculografia. Il dotto eiaculatore sinistro (freccia) è dislocato lateralmente da una cisti intraprostatica mülleriana (*) non comunicante con le vie seminali, e pertanto non opacizzata dal mezzo di contrasto.

forma di cisti mediane localizzate nel contesto della prostata. Le cisti di maggiori dimensioni possono debordare cranialmente in sede retrovescicale.

Le cisti di origine mülleriana per definizione non comunicano con i dotti eiaculatori, ma su di essi esercitano un'ostruzione secondaria per compressione estrinseca, dislocandoli lateralmente (alla deferentovesiculografia i dotti eiaculatori assumono un aspetto "a chele di granchio") (Colpi et al., 1990) (Fig. 28).

Il meccanismo ostruttivo delle cisti del seno urogenitale è del tutto differente. I dotti eiaculatori infatti non vengono compressi, ma sboccano direttamente nella cavità cistica a fondo cieco (non comunicante o parzialmente comunicante con l'uretra). Pertanto, contrariamente a quanto accade nelle cisti mülleriane, in queste cisti si possono trovare spermatozoi.

Tra le anomalie di origine wolffiana si distinguono le agenesie delle vescicole seminali, delle ampolle deferenziali e dei dotti eiaculatori, oltre che le displasie pseudocistiche delle stesse strutture (Figg.10,11). Molto spesso si associano a concomitante agenesia del dotto deferente omolaterale, o del rene e dell'emitrigono (Beeby, 1974). Più raramente è presente uno sbocco ectopico dell'uretere nella vescicola seminale (Das & Amar, 1980).

2) Anomalie anatomiche acquisite

Le (sub-)ostruzioni anatomiche acquisite delle vie seminali distali sono spesso localizzate ai dotti eiaculatori e sono riconducibili ad esiti di processi infettivi specifici (tubercolosi) o, più frequentemente, aspecifici. Altre cause frequenti sono quella litiasica (incuneamento di calcoli seminali nel lume dei dotti eiaculatori)(Figg. 21, 26, 27) e quella iatrogena (danneggiamento dello sbocco dei dotti in uretra da cateterismo o da altre manovre urologiche) (Fig. 29).

Di rara osservazione è la sclerosi tubercolare delle vescicole seminali e delle ampolle deferenziali.



Fig. 29: Ostruzione totale del dotto eiaculatore destro (freccia) in esiti di transurethral microwave thermotherapy (TUMT) effettuata per prostatodinia in un paziente di 33 anni. Successivo riscontro di azoospermia associata e volume seminale ridotto e pH seminale acido

3) Anomalie funzionali

Le ostruzioni delle vie seminali distali su base funzionale sono state scoperte grazie alla deferentovescicolografia e si distinguono per la frequente assenza di alterazioni anatomiche dei dotti eiaculatori (Ichijo et al., 1981; Colpi et al., 1987; Pryor & Hendry, 1991). Si tratta molto probabilmente di disfunzioni di origine neurologica locale (alcuni quadri ricordano il dolicomegacolon o le dissinergie vescico-sfinteriche) o sistemica (sono state evidenziate in soggetti affetti da diabete giovanile e da rene policistico autosomico dominante) (Hendry et al., 1998). Radiologicamente si distinguono forme di atonia vescicolare e/o ampollare, forme di ipertonia duttale e di dissinergia tra ampolle/vescicole e dotti eiaculatori (Colpi et al., 1992).

Tutte le citate anomalie potenzialmente responsabili di un disturbato svuotamento delle vie seminali distali sono di norma evidenziabili con l'ecografia transrettale, seppure spesso in modo aspecifico.

DIAGNOSTICA STRUMENTALE ECOGUIDATA

Quando nel corso della TRUS si osserva una cisti intraprostatica mediana non è possibile stabilire con certezza se si tratta di cisti comunicante o non comunicante con i dotti eiaculatori. In questi casi l'ecografia operativa consente di stabilire una eventuale soluzione di continuità della

cisti con una o entrambe le vie seminali distali. Previa copertura antibiotica per via orale a partire dal terzo giorno antecedente all'esame (trimetoprim 0,32 g + sulfametossazolo 1,6 g/die per os) e previo enteroclima di pulizia sei ore e poi mezz'ora prima dell'indagine con Bacitracina 5000 U.I. + Neomicina solfato 50 mg, si aspira il contenuto della cisti per via transrettale ecoguidata con ago Chiba 22 G. Il liquido viene analizzato per la ricerca di spermatozoi. La loro presenza conferma che si tratta di cisti comunicante con le vie seminali. In assenza di spermatozoi, bisogna far ejaculare il paziente e ricontrollare subito dopo la cisti. Se la stessa non risulta visibile significa che la cisti non comunica con le vie seminali; se appare nuovamente distesa (dal fluido seminale) significa che la cisti comunica con almeno una via seminale, ma soprattutto che coesiste una ostruzione epididimaria oppure una patologia secretoria gonadica (come si può dedurre dalla persistente assenza di spermatozoi).

TRATTAMENTO STRUMENTALE ECOGUIDATO DELLE OSTRUZIONI CISTICHE DELLE VIE SEMINALI DISTALI

La TRUCA (Trans-Rectal Ultrasonically-guided Cyst Aspiration) (Colpi et al., 1994a) è una metodica minimamente invasiva, indicata prevalentemente per le cisti mülleriane non comunicanti con i dotti eiaculatori ed esercitanti su questi ultimi una compressione estrinseca. L'aspirazione della cisti e la sua eventuale sclerotizzazione producono una temporanea o definitiva normale pervietà delle vie seminali distali. Per la sclerotizzazione si instillano nella cisti rolitetraciclina in quantità pari a 1/10 del volume precedentemente aspirato. Abbiamo sottoposto ad aspirazione di cisti mülleriana non-comunicante con le vie seminali distali 29 soggetti (età: mediana 33,5 anni, range 25-45 anni) dei quali 20 erano affetti da infertilità (durata 1-20 anni, mediana 3 anni; secondaria in 7 soggetti); cinque

	Pre-TRUCA			Post-TRUCA		
	media	mediana	range	media	mediana	range
Volume Seminale (ml)	2,3	1,8	0,5-8	3,4	2,9	0.8-11 *
Conta sperm. totale (x 10 ⁶)	75,3	37,7	0-445	201,5	93,0	0-1375 §

(* p=0.0001; § p=0.0006)

Tabella 2 : Risultati seminali dopo TRUCA (vedi testo).

pazienti erano affetti da emospermia e quattro lamentavano dolore ejaculatorio in sede pelvica o scrotale. Una patologia secretoria testicolare coesisteva in 10 dei 20 pazienti infertili. In tutti i casi la cisti è stata completamente svuotata (volume aspirato: range 0,3-14 ml; media 1,9 ml, mediana 0,7 ml). Il volume seminale e la conta spermatica totale prima e dopo il trattamento sono riportati nella Tab. 2.

Nessuna complicanza è stata osservata.

In 7 pazienti si è avuta recidiva anche dopo sclerotizzazione. In un paziente azoospermico il quadro seminale si è definitivamente normalizzato dopo l'aspirazione.

In 16 coppie infertili controllate ad un follow-up a 18 mesi si sono ottenute due gravidanze spontanee (un caso di infertilità primitiva da 8 anni; un caso di azoospermia con normalizzazione dei parametri seminali). Altre due gravidanze a termine sono state ottenute con inseminazione intrauterina e IVF temporizzate alla aspirazione della cisti.

I tassi di successo, la semplicità di esecuzione anche per piccole cisti mülleriane, il basso costo (non richiede ricovero) e l'assenza di complicazioni promuovono il TRUCA a trattamento di prima scelta nelle ostruzioni dei dotti ejaculatori da cisti mülleriana non comunicante con le vie seminali.

QUALI SONO I PARAMETRI ECOGRAFICI PREDITTIVI DI UNA (SUB-)OSTRUZIONE DELLE VIE SEMINALI DISTALI?

Colpi et al.(1997) hanno analizzato quali tipi di alterazione ecografica delle vie seminali distali risultano maggiormente predittive di sub-ostruzione e quindi di alterazione seminale. Come gold-standard

diagnostico è stato utilizzato il Seminal Tract Washout (Colpi et al., 1994b).

La presenza di almeno una vescicola seminale ectasica (diametro antero-posteriore ≥ 15 mm) si associa tre volte su quattro ad una sub-ostruzione distale (Colpi et al., 1997b).

Tuttavia la concomitante presenza di ipoposia (volume seminale $\leq 1,5$ ml) porta la positive predictive value (PPV) a raggiungere il 100%, anche se a scapito di una bassissima sensibilità (51,8%) (vale a dire che una sub-ostruzione distale può essere presente anche in soggetti con vescicole seminali non dilatate o con volume seminale apparentemente normale).

La presenza di aree anecoiche policicliche nelle vescicole seminali (stasi vescicolare) si associa ad un quadro di sub-ostruzione nel 64,1% dei casi, arrivando al 91,6% qualora esista una consensuale ipoposia. L'assenza di stasi associata ad un volume seminale $> 1,5$ ml consente di escludere una sub-ostruzione 97,6 volte su 100, con una specificità dell'80%.

Tutte le altre anomalie ecografiche non si sono singolarmente dimostrate utili sotto il profilo predittivo. Le cisti mülleriane (anche in presenza di volume seminale ridotto) sono risultate responsabili di sub-ostruzione 6 volte su 10 (PPV 58,3%), indipendentemente dalla loro dimensione (maggiori o minori di 10 mm di diametro). Anche le calcificazioni del veru, la dilatazione dei dotti ejaculatori e la presenza di formazioni litiasiche nei dotti ejaculatori si sono correlate con un reale disturbo di svuotamento solo in circa la metà dei casi.

Pertanto l'ecografia transrettale appare sufficientemente predittiva di sub-ostruzione delle vie seminali distali solo quando in un soggetto dispermico siano presenti

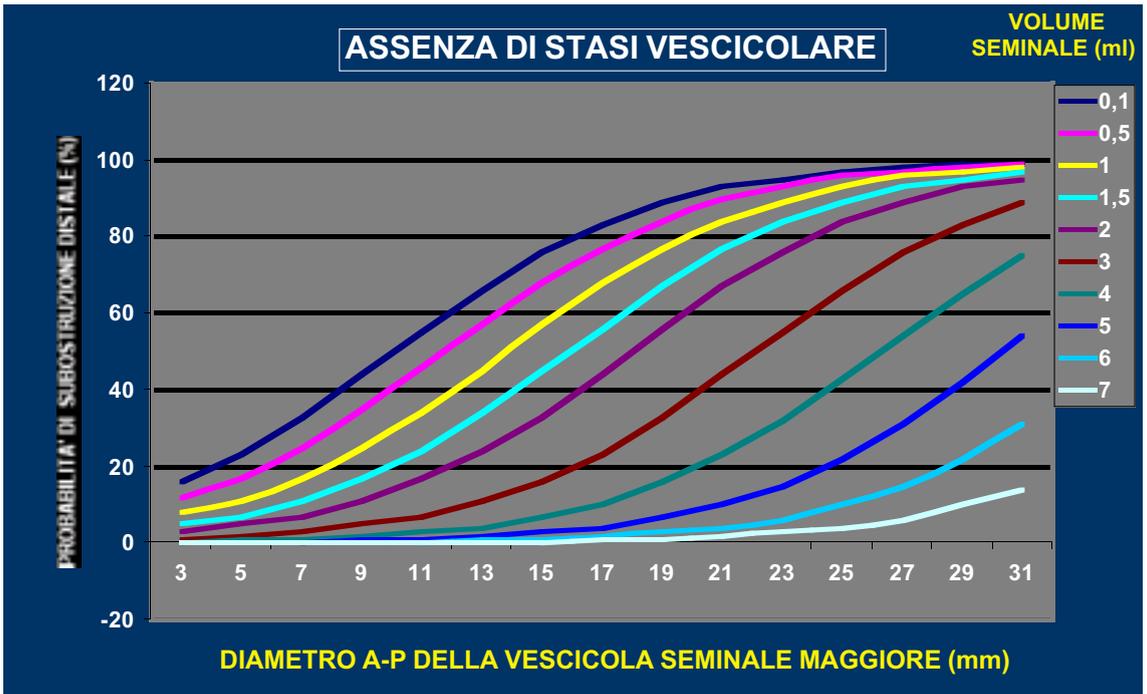


Grafico 1

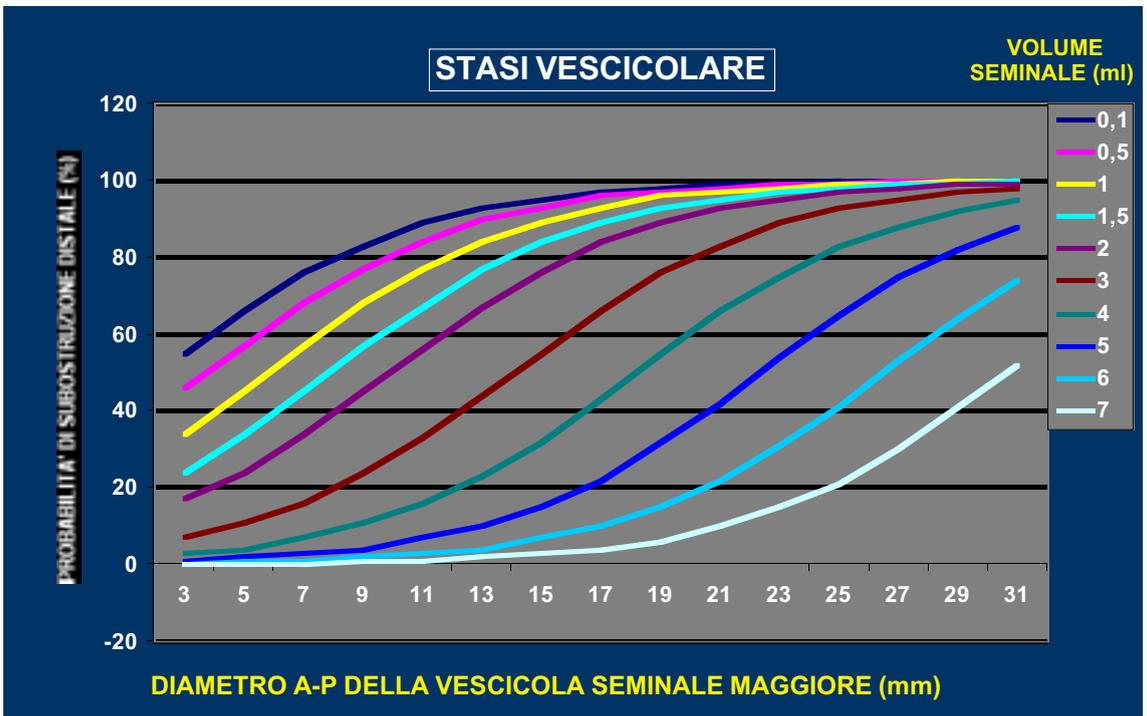


Grafico 2

vescicole seminali dilatate e con segni di stasi.

Utilizzando una Stepwise Logistic Regression (SLR) Analysis è stato possibile allestire due grafici di predittività di sub-ostruzione delle vie seminali distali in relazione ai parametri:

- 1) volume dell'eiaculato
- 2) diametro antero-posteriore della vescicola seminale maggiore post-eiaculazione
- 3) assenza (Grafico 1) o presenza (Grafico 2) di aree anecoiche nella vescicola seminale.

Tali grafici possono risultare utili nella pratica clinica, fornendo le probabilità di sub-ostruzione delle vie seminali distali in ogni singolo paziente del quale si conoscano il volume elaculato, il diametro antero-posteriore e l'ecopattern della vescicola seminale di maggiori dimensioni.

A scopo esemplificativo presentiamo il caso di un paziente con volume seminale di 1,5 ml e con almeno una vescicola seminale del diametro antero-posteriore di 15 mm, senza segni di stasi. Sulla base del nostro modello statistico, la probabilità che ci sia una sub-ostruzione delle vie seminali distali è pari al 45% (grafico 1). Se lo stesso paziente avesse un volume seminale pari a 2 ml, la probabilità scenderebbe al 33%. Per contro, se lo stesso paziente avesse segni di stasi liquida intravescicolare, la probabilità salirebbe rispettivamente al 84% (per volume seminale pari a 1,5 ml) e al 76% (per volume seminale pari a 2 ml)(grafico 2).

Pertanto in presenza di elevata probabilità di patologia subostruttiva delle vie seminali distali, il trattamento di ulteriori fattori di dispermia (p.e. varicocele, disfunzioni endocrine) potrebbe risultare vano.

BIBLIOGRAFIA

Beeby DI.

Seminal vesicle cyst associated with ipsilateral renal agenesis: case report and review of literature. J Urol 112:120-122, 1974.

Boreau J.

Images of the Seminal Tracts.

Basel, Karger, 1974.

Colpi GM, Casella F, Zanollo A, Ballerini G, Balerna M, Campana A, Lange' A.

Functional voiding disturbances of the ampullo-vesicular seminal tract: a cause of male infertility.

Acta Eur Fertil 18:165-79, 1987.

Colpi GM, Negri L, Mariani ME, Balerna M.

Semen anomalies due to voiding defects of ampullo-vesicular tract.

Andrologia 22 (suppl. 1):206-218, 1990.

Colpi GM, Negri L, Mariani ME, Aydos K, Del Favero C.

Male distal genital tract ultrasonography in excretory infertility.

In: Diagnosing Male Infertility - New Possibilities and Limits. GM Colpi & D Pozza (eds), Basel, Karger, pp. 119-129, 1992.

Colpi GM, Negri L, Scroppo FI, Grugnetti C.

Ultrasonically guided treatment of anomalies of uroseminal carrefour.

In: Treating Male Infertility - New Possibilities. GM Colpi & M. Balerna (eds), Basel, Karger, pp. 187-198, 1994a.

Colpi GM, Negri L, Scroppo FI, Grugnetti C, Patrizio P.

Seminal Tract Washout: a new diagnostic tool in complicated cases of male infertility.

J Androl 15 (Supplement):17S-22S, 1994b.

Colpi GM, Negri L, Scroppo FI, Grugnetti C.

Genital ultrasonography in male infertility.

Presented at 6th International Meeting of European Association for Genital Microsurgery, Lisboa, November 21-23, 1997a

Colpi GM, Negri L, Nappi RE, Chinea B.

Is transrectal ultrasonography a reliable diagnostic approach in ejaculatory duct sub-obstruction?

Hum Reprod 12:2186-2191, 1997b.

Das S & Amar AD.

Ureteral ectopia into cystic seminal vesicle with ipsilateral renal dysgenesis and monorchia.

J Urol 124:574-575, 1980.

Elder JS & Mostwin JL.

Cyst of the ejaculatory duct/urogenital sinus.
J Urol 132:768-771, 1984.

Gil Vernet S.

Biología y patología de la prostata. In: Patología Urogenital. Madrid, Paz Montaldo. Tomo 2°, Vol.1°.1953.

Harada K.

Prostatic calculi.

In: Diagnostic Ultrasound in Urology and Nephrology. H Watanabe, KK Holmes, HH Holm, PK Goldberg (eds.) Tokio, Igaku-Shoin, pp. 171-175, 1981.

Hendry WF, Rickards D, Pryor JP, Baker LRI.

Seminal megavesicles with adult polycystic kidney disease.

Hum Reprod 13:1567-1569, 1998.

Ichijo S, Sigg C, Nagasawa M, Sirawa Y.

Vasoseminal vesiculography before and after ejaculation

Urol Intern 36:35-45, 1981.

Littrup PJ, Lee F, McLeary RD, Wu D, Lee A, Kumasaka GH.

Transrectal US of the seminal vesicles and ejaculatory ducts: clinical correlation.

Radiology 168:625-628, 1988.

Ludwig M, Weidner W, Schroeder-Printzen I, Zimmermann O, Ringert RH.

Transrectal prostatic sonography as a useful diagnostic means for patients with chronic prostatitis or prostatodynia.

Brit J Urol 73:664-668, 1994.

Mayersak JS.

Urogenital sinus-ejaculatory duct cyst: a case report with a proposed clinical classification and review of the literature.

J Urol 142: 1330-1332, 1989.

Nickel JC, Nyberg LM, Hennenfent M.

Research guidelines for chronic prostatitis: consensus report from the first National Institutes of Health International Prostatitis Collaborative Network.

Urology 54:229-233, 1999.

Pryor JP & Hendry WF.

Ejaculatory duct obstruction in subfertile males: analysis of 87 patients.

Fertil Steril 56:725-730, 1991.

Purvis K & Christiansen E.

The impact of infection on sperm quality
J Brit Med Soc 1:31-41, 1995.

Schurhke TD & Kaplan GW.

Prostatic utricle cyst (Müllerian duct cyst).
J Urol 119: 765-767, 1978.

Villers A, Terris MK, McNeal JE, Stamey TA.

Ultrasound anatomy of the prostate: the normal gland and anatomical variations.

J Urol 143:732-738, 1990.

RICANALIZZAZIONE MICROCHIRURGICA DELLA VIA SEMINALE PROSSIMALE

José M^a Pomerol

Servicio de Andrologia, Fundació Puigvert (Barcelona)

Introduzione

La via seminale può ostruirsi a qualsiasi livello, dalla rete testis fino al dotto eiaculatore. L'ostruzione può essere totale o parziale, a uno o più livelli, monolaterale o bilaterale, congenita o acquisita. A seconda delle caratteristiche dell'ostruzione, all'esame seminale si può riscontrare azoospermia (quando l'ostruzione è totale e bilaterale) od oligozoospermia (quando l'ostruzione è parziale bilateralmente oppure totale da un solo lato). Nella pratica clinica la forma più frequente di ostruzione è quella completa, bilaterale e allo stesso livello.

In linea generale la via seminale può ostruirsi per compressione estrinseca (p.e. cisti mulleriane intraprostatiche) o per resezione iatrogena del dotto deferente (p.e. in corso di erniorrafia inguinale o di orchidopessi) o del tubulo epididimario (p.e. in corso di excisione di cisti) o traumatica. La via seminale può anche interrompersi e terminare a fondo cieco per difetti congeniti.

In 252 pazienti affetti da azoospermia escretoria abbiamo riscontrato una ostruzione epididimaria nel 73% dei casi, deferenziale nel 4%, del dotto eiaculatore nel 2%, e nel testicolo nell' 1%. Nel rimanente 20% dei pazienti era presente una agenesia bilaterale dei dotti deferenti.

In questo articolo affronteremo tutti gli aspetti correlati all'ostruzione dell'epididimo e del deferente, vale a dire del primo tratto della via seminale.

Formazione microchirurgica

Il tubulo epididimario e il dotto deferente hanno un lume rispettivamente di 0,1 e 0,3

mm e pertanto, quando risultino ostruiti, devono essere ricanalizzati con procedure microchirurgiche. Per questo motivo chiunque si dedichi al trattamento chirurgico del maschio infertile deve acquisire una competenza microchirurgica tramite corsi di microchirurgia generale (per apprendere le tecniche di base). Successivamente dovrà disporre dei mezzi adeguati (microscopio operatore, strumentario microchirurgico, fili di sutura specifici) per poter applicare su animali da esperimento le tecniche apprese al corso.

Generalmente si inizia realizzando l'anastomosi dell'arteria femorale o carotidea del ratto, quindi l'anastomosi venosa e successivamente la chirurgia vascolare più complessa. Intensificando l'attività pratica sulla via seminale, si possono realizzare vasovasostomie ed epididimovasostomie. Le anastomosi del deferente possono anche essere praticate su segmenti di dotto deferente umano rimossi in corso di vasectomia.

Quando si è acquisita una sufficiente abilità in laboratorio sperimentale, si può iniziare la pratica microchirurgica sull'uomo, aiutati da un collega già esperto (*Pomerol, 1994a*). La chirurgia più idonea per iniziare è la varicocelectomia inguinale, in cui si pratica la dissezione e legatura delle piccole vene che costituiscono il plesso venoso spermatico.

Se la qualità dello strumentario microchirurgico risulta importante per la riuscita di una anastomosi, lo sono ancora di più la pratica e l'esperienza, e pertanto è necessario realizzare tale tecnica il più frequentemente possibile. Se ciò non fosse possibile, le competenze acquisite devono essere mantenute ricorrendo al laboratorio sperimentale, in particolare quando si è all'inizio della formazione microchirurgica.

Versione italiana a cura di
Luciano Negri & Alessandro Pizzocaro

Chirurgia ricostruttiva della via seminale vs. ICSI

Dato che le tecniche di fecondazione assistita e in particolare l'iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI) permettono di ottenere gravidanze con spermatozoi recuperati chirurgicamente dal testicolo o dalla via seminale, si dibatte attualmente se valga ancora la pena sottoporre i pazienti azoospermici a ricanalizzazione microchirurgica delle vie seminali ostruite o non sia meglio ricorrere in prima battuta alle suddette tecniche di fecondazione assistita. Per dimostrare quale di queste tecniche sia la più adeguata, è necessario innanzitutto analizzare criticamente alcune variabili correlate alla coppia infertile:

- età della moglie
- fattore femminile
- durata dell'infertilità
- livello e natura del processo ostruttivo
- eventuali trattamenti precedentemente instaurati
- disponibilità della coppia in merito alle diffe-
renti alternative.

Secondo il nostro parere, quando l'età della moglie non sia elevata (≤ 35 anni) e non ci sono gravi anomalie ginecologiche (p.e. ostruzione tubarica bilaterale), si deve sempre consigliare la chirurgia ricostruttiva in relazione alla sua innocuità, al fatto che non è necessario coinvolgere la partner nel trattamento, al minor costo economico, al minor coinvolgimento emotivo, alla minor complessità e alla possibilità di ottenere una o più gravidanze in modo naturale. Inoltre, durante la chirurgia ricostruttiva si possono aspirare e crioconservare spermatozoi da utilizzare successivamente per ICSI, eliminando la necessità di reintervenire sul maschio. In aggiunta, quando il paziente si ricanalizza, ma la qualità del seme risulta scadente, è sempre possibile realizzare la ICSI senza dover nuovamente praticare un intervento chirurgico.

OSTRUZIONE EPIDIDIMARIA

Eziologia e fisiopatologia

L'epididimo può ostruirsi a qualsiasi livello, dai coni efferenti fino alla cauda. L'ostruzione può interessare un singolo tubulo oppure coinvolgere un ampio segmento dell'organo che include varie anse tubulari.

Le cause più frequenti di ostruzione epididimaria acquisita sono le infiammazioni, i traumi e le ostruzioni delle vie seminali distali (dotti deferenti o dotti eiaculatori). In questo ultimo caso infatti si viene a creare una iperpressione in tutta la via seminale, che può arrivare a rompere i tubuli epididimari. Lo stravasamento di materiale seminale nell'interstizio epididimale provoca la formazione di un granuloma che a sua volta coinvolge i tubuli adiacenti incrementando l'entità dell'ostruzione.

Tra le cause congenite di ostruzione epididimaria la più nota è l'agenesia dei dotti deferenti, cui si associa molto spesso anche l'agenesia della cauda e del corpus epididymis. Tale anomalia è causata da una mutazione del gene della fibrosi cistica (*Jarvi et al., 1995*). Altre forme di ostruzione congenita dell'epididimo sono probabilmente frequenti, ma anche difficili da diagnosticare. Tra queste citiamo la Sindrome di Young (*Young, 1970*), caratterizzata da infezioni croniche delle vie aeree ed ostruzione epididimaria. Responsabile di entrambe le manifestazioni cliniche è un'alterata motilità delle ciglia che, a livello epididimario, provoca un'inibizione del transito ed un accumulo di spermatozoi. Il materiale seminale, degenerando, arriva ad ostruire il lume tubulare.

Numerose ostruzioni epididimarie tuttavia vengono ancora catalogate come idiopatiche, essendo impossibile determinare la natura congenita o acquisita del processo. Nel primo caso la prognosi è sicuramente peggiore, data la durata dell'ostruzione e quindi delle ripercussioni negative sulla funzionalità dell'organo, una volta ripristinata la canalizzazione con la microchirurgia.

Non infrequentemente poi le ostruzioni epididimarie congenite si associano a malformazioni congenite della via seminale distale (Jarvi et al., 1998).

Diagnosi

La diagnosi di ostruzione epididimaria completa bilaterale viene formulata quando l'azoospermia si associa ad un volume seminale normale ed a una spermatogenesi conservata, e all'anamnesi non emergono dati indicativi di patologia deferenziale (Pomerol, 1994b). In corso di biopsia testicolare bilaterale realizzata in anestesia locale, mediante un'unica incisione scrotale di 1-2 cm, è importante osservare le caratteristiche macroscopiche della testa dell'epididimo. L'assenza di dilatazione del tubulo epididimario potrebbe svelare la presenza di una ostruzione intratesticolare, cosa che è poco frequente. In nessun caso è necessario esporre la totalità del contenuto scrotale, dato che le aderenze che possono formarsi tra l'albuginea e la tunica vaginale possono rendere difficoltosa la ricanalizzazione microchirurgica. In questi pazienti è importante anche determinare la presenza di anticorpi sierici antispermatozoo e di una eventuale infezione (spermiocoltura e ed esame microbiologico della secrezione prostatica). Una infezione delle vie seminali può infatti essere responsabile dell'ostruzione della anastomosi microchirurgica.

Tecnica chirurgica

Scopo della chirurgia ricostruttiva epididimaria è il ripristino della pervietà tra il tubulo epididimario ed il dotto deferente. L'epididimo-vasostomia (EV) latero-terminale rappresenta la tecnica di elezione. La tecnica da noi utilizzata presenta alcune varianti rispetto a quella descritta da vari autori (Wagenknecht et al., 1980; Fogdestam et al., 1986; Thomas, 1987).

Data la durata dell'intervento, la EV va realizzata in anestesia generale o spinale. Attraverso un'incisione scrotale longitudinale si espone il dotto deferente a livello della porzione rettilinea scrotale e lo si emiseziona trasversalmente sulla faccia anteriore fino ad esporre il lume del dotto. Questo viene incannulato in senso anterogrado con un cateterino venoso pediatrico e in esso si inietta soluzione fisiologica al fine di verificare la pervietà della via seminale distale (fig.1a). Questa è la manovra di maggior importanza poichè permette di evitare di aprire inutilmente il tubulo epididimario in quei casi (non frequenti) in cui potrebbe esistere un'ostruzione del dotto deferente o del dotto eiaculatore che controindicherebbero l'esecuzione della ricanalizzazione microchirurgica.

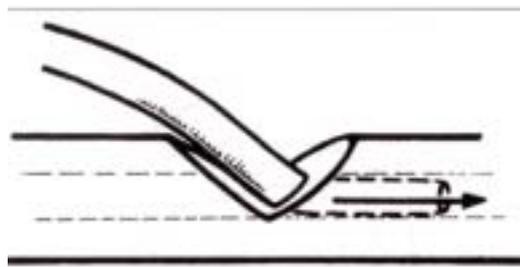


Fig. 1a

Si procede quindi a creare una "finestra" nella vaginale che riveste l'epididimo (fig. 1b).

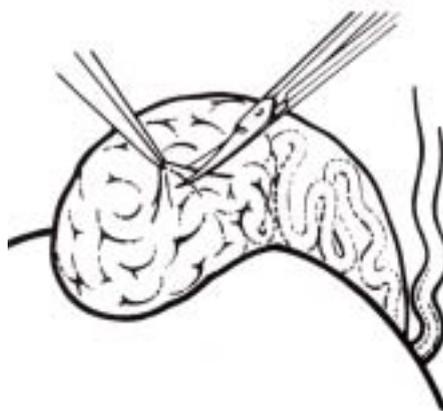


Fig. 1b

L'incisione deve avere un diametro pari a quello del dotto deferente (fig. 1c) e deve essere praticata il più distalmente possibile rispetto alle anse tubulari dilatate.

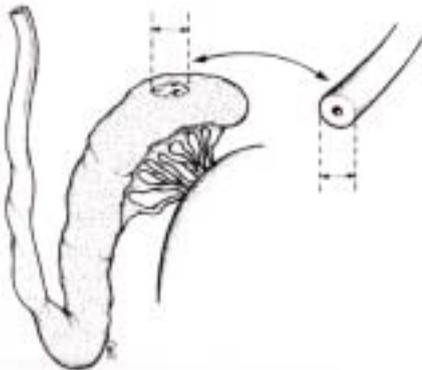


Fig. 1c

Comprimendo l'epididimo con le dita a livello dell'incisione, si fanno protrudere le anse tubulari (Fig. 2a). Si identifica la migliore e la si inizia a liberare dal tessuto connettivo circostante (fig. 2b).

Marmar (1995) propone di far passare un punto di nylon monofilamento di 11-0 attraverso la parete del tubulo al fine di permettere la trazione prima di inciderlo. Con una forbicina microchirurgica o con un microbisturi si pratica una incisione circolare a livello della zona di massima convessità dell'ansa (fig. 2c), facendo attenzione a che il suo diametro sia il più vicino possibile a quello del lume del deferente (fig. 2d).

Una goccia del materiale seminale che fuoriesce dalla apertura del tubulo epididimario viene posta su un vetrino che viene immediatamente consegnato ad un biologo (presente in sala operatoria) per verificare la presenza e la qualità degli spermatozoi secondo la classificazione di Silber (Tabella 1).

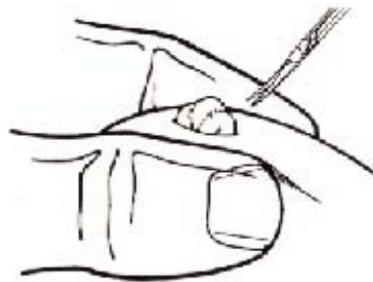


Fig. 2a

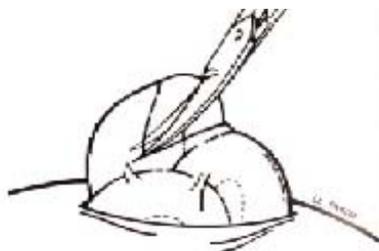


Fig. 2b

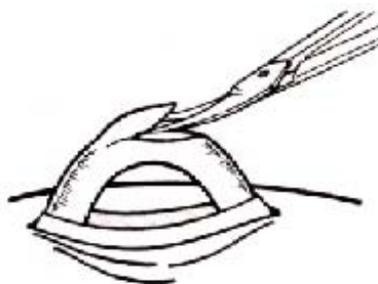


Fig. 2c

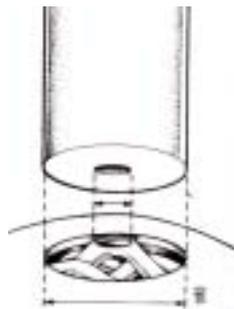


Fig. 2d

Tabella 1: Classificazione di Silber

- 1 Spermatozoi prevalentemente mobili
- 2 Spermatozoi normali prevalentemente immobili
- 3 Rari spermatozoi normali, numerose teste
- 4 Solo teste di spermatozoi
- 5 Assenza di spermatozoi

Se gli spermatozoi sono assenti o risultano totalmente immobili, si isolano altre anse tubulari sempre più prossimali arrivando, se necessario, ai coni efferenti. Una volta trovati spermatozoi idonei, prima di procedere alla sutura microchirurgica, li si aspira mediante una metodica ideata dalla nostra équipe (Ruiz-Romero *et al.*, 1994) (fig. 3) e li si invia in laboratorio per crioconservazione. E' importante realizzare una buona emostasi dei piccoli vasi sanguinanti con pinza da coagulazione bipolare.



Fig. 3

Si completa la sezione trasversale del deferente e si libera la parte distale dello stesso mediante l'aiuto di forbici e di un tampone in modo da dislocarla facilmente e senza tensione fino al punto in cui deve essere praticata l'anastomosi. Quest'ultima viene iniziata dando 3 o più punti di nylon 9-0 monofilamento tra il versante interno della vaginale epididimaria e quella muscolare deferenziale (fig.4a). Questa manovra facilita l'avvicinamento di due lembi di anastomosi. Si procede quindi dando 2 o 3 punti di nylon monofilamento 10-0 sul margine posteriore del tubulo epididimario e la mucosa del lume deferenziale (fig.4b). Ci sono autori che sostengono sia utile impregnare il lume del

tubulo epididimario con una o due gocce di blu di metilene. La periferia del tubulo si tinge di blu, mentre il lume conserva il suo colore, agevolando la sutura (Belker, 1994; Niederberger & Ross 1993).

Affinchè i nodi rimangano nella parte esteriore dell'anastomosi, l'ago deve entrare dall'esterno verso l'interno del tubulo e dall'interno verso l'esterno della mucosa del deferente.

Si completa l'anastomosi di entrambi i lumi con 2 o 3 punti sulla faccia anteriore (fig.4c).

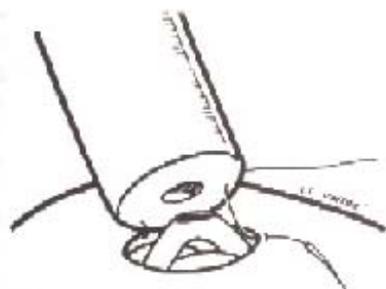


Fig. 4a



Fig. 4b

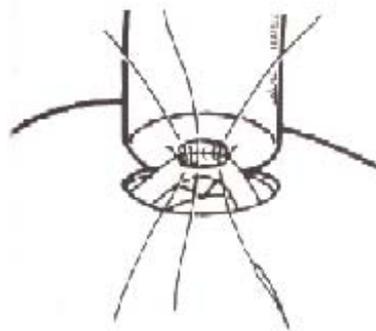


Fig. 4c

Per facilitare il controllo costante del lume del tubulo epididimario mentre si danno i punti, è fondamentale non annodare i fili fino a quando non sono stati tutti apposti. L'operazione termina dando 3 o 4 punti di nylon 9-0 monofilamento tra le facce anteriori della muscolare deferenziale e della tunica epididimaria (fig.4d).



Fig. 4d

Recentemente, abbiamo modificato la tecnica utilizzando fili di nylon 10-0 da 2,5 cm con doppio ago. Una volta realizzata l'apertura del tubulo epididimario si passano i doppi aghi di sutura alle ore 2, 5, 8 e 10 del margine tubulare (fig. 5a).

Si appongono poi tre punti di rinforzo in nylon 9-0 tra la muscolare deferenziale posteriore e la vaginale epididimaria (come già precedentemente descritto). Quindi i quattro punti apposti sul tubulo epididimario vengono passati attraverso la mucosa del lume deferenziale (figg. 5b, 5c). L'atto chirurgico termina dando gli ultimi 3 punti di rinforzo in nylon 9-0 tra la vaginale epididimaria e lo strato anteriore della muscolare deferenziale (fig. 5d). Questa tecnica permette un controllo costante del tubulo epididimario, così come un minor tempo chirurgico.

Recentemente, *Marmar (2000)* ha descritto un'altra tecnica di invaginazione del tubulo epididimario nel lume deferenziale utilizzando solo due fili di sutura con doppio ago. Questi vengono fatti passare attraverso la parete del tubulo epididimario che viene poi inciso tra i due fili.

Ogni filo viene quindi fatto passare attraverso la mucosa e la muscolare del dotto defe-

rente. Per applicare questa tecnica in maniera adeguata è importante che il tubulo epididimario sia sufficientemente dilatato.

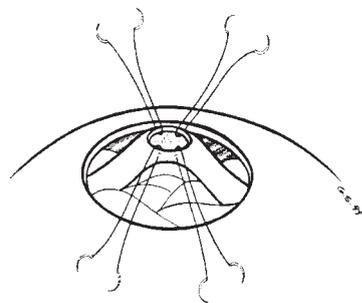


Fig. 5a

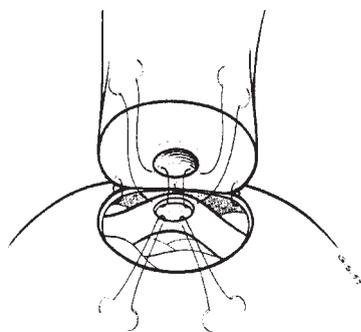


Fig. 5b

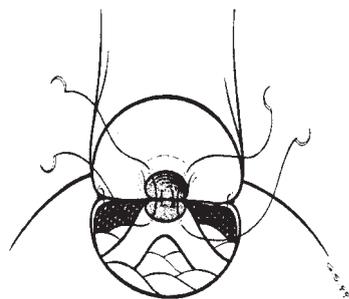


Fig. 5c

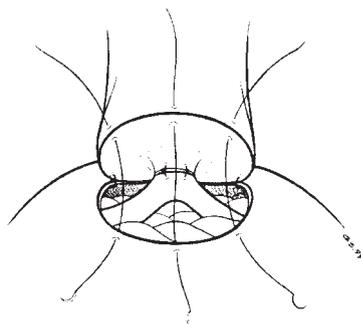


Fig. 5d

Si consiglia di lasciare per 24 ore un drenaggio in aspirazione di buon calibro nella parte inferiore di entrambi gli emisroti. Il paziente viene dimesso il giorno successivo all'intervento, con obbligo di portare un sospensorio, assumere antiinfiammatori non steroidei e col consiglio di mantenere una astinenza sessuale per 20 giorni.

Quando nel 1985 abbiamo iniziato a praticare la epididimo - vasostomia, la tecnica di elezione era quella termino-terminale descritta da Silber, che consisteva nella sezione trasversale dell'epididimo in toto e nella anastomosi del tubulo, dal quale fuoriusciva costantemente del fluido seminale, con il lume del dotto deferente (*Silber, 1978b*). Successivamente abbiamo optato per quella latero-terminale per il fatto che è una tecnica meno aggressiva e offre meno difficoltà nella selezione del tubulo epididimario da anastomizzare. *Schlegel e Goldstein (1993)* non hanno trovato differenze significative in termini di ricanalizzazione utilizzando le due tecniche.

Ad un mese dall'intervento si può praticare il primo spermioγραμμα, anche se nella maggior parte dei casi gli spermatozoi compaiono dopo qualche mese dall'intervento. Matthews in una revisione di 100 casi trattati, ha osservato che il tempo medio necessario perché appaiano gli spermatozoi all'esame seminale è di 3,6 mesi e di 1 anno per completare il processo di canalizzazione (*Matthews et al., 1995*). Nella serie pubblicata da *Jarow et al. (1995)*, il tempo medio di comparsa degli spermatozoi è di 6 mesi. La spiegazione più verosimile è che l'edema prodotto dal semplice passaggio dell'ago attraverso la fine parete dell'epididimo mantenga temporaneamente chiusa l'anastomosi. Non si può escludere che gli spermatozoi quando possiedono una buona motilità favoriscano un'apertura più rapida dell'anastomosi. *Niederberger e Ross (1993)* ritengono unico fattore prognostico per il buon esito della EV il riscontro di spermatozoi in sede intraoperatoria, indipendentemente dalla loro

motilità. Il ritardo di ricanalizzazione potrebbe essere anche spiegato come la conseguenza di un'anastomosi poco precisa o di una cicatrizzazione anomala che determina una riostruzione. Gli spermatozoi, che cercano di trovare la continuità della via, spingeranno nel punto più debole dell'anastomosi, fino ad aprirsi il cammino verso la via distale. Se a 12 mesi dall'intervento non compaiono spermatozoi nell'eiaculato, la prognosi deve essere considerata negativa e pertanto si deve valutare la possibilità di praticare un nuovo intervento chirurgico ricostruttivo con recupero degli spermatozoi e ICSI successiva, sempre che quest'ultima tecnica non possa essere realizzata mediante spermatozoi crioconservati durante il primo intervento.

In molti casi, dopo la EV possono comparire spermatozoi nell'eiaculato in numero ridotto o di scarsa qualità. Non sempre la causa risulta chiara anche se è spesso plausibile una riostruzione parziale od una alterazione tubulare morfologica o neurologica, secondarie a processi ostruttivi di lunga data. Non si può neppure escludere che tale fenomeno sia da imputare alla presenza di anticorpi antispermatozoo (quando siano dimostrabili). Nonostante ciò, se in questi casi non si ottiene una gravidanza spontanea, è possibile utilizzare gli spermatozoi eiaculati per procedere alla ICSI senza la necessità di reintervenire.

La prognosi relativa al recupero della fertilità e all'ottenimento di gravidanza spontanea è migliore nelle ostruzioni epididimarie acquisite e di breve durata (*Matsuda et al., 1993*), quando l'ostruzione si trova a livello distale (cauda epididymis), quando gli spermatozoi nei tubuli epididimari sono di buona qualità e quando la donna è giovane e non presenta alcuna patologia.

Nella tabella 2 vengono riportati i risultati più importanti pubblicati in letteratura. In molti di questi l'eziologia dell'ostruzione epididimaria è la vasectomia (che conferisce una prognosi migliore); in altri casi la causa non è nota.

Autore/anno	Casi	Tecnica	Pervietà anastomosi (%)	Gravidanze (%)
SILBER 1978	14	T-T	86,0	-
MCLOUGHLIN 1982	23	-	-	39,0
DUBIN 1984	46	T-T	39,0	13,0
WAGENKNECHT 1985	50	L-T	-	23,0
FOGDESTAM 1986	41	L-T	85,3	36,6
THOMAS 1986	50	L-T	66,0	41,9
LEE 1987	158	T-T	37,0	20,0
NIEDERBERGER 1993	22	L-T	48,0	18,0
MATSUDA 1994	26	T-T/L-T	80,8	41,7
MARMAR 1995	10	L-T	73,6	42,0
MATTHEWS 1995	100	T-T/L-T	65,0	21,0
JAROW 1995	89	L-T	56,0	-

Tabella 2:

Risultati delle epididimovasostomie

(T-T = Termino-Terminale ; L-T = Latero-Terminale)

La presenza di spermatozoi nel seme dopo la chirurgia varia tra il 39% e l'86%, e le gravidanze variano tra il 13% ed il 42% (*Silber, 1978b; Wagenknecht et al., 1980; Fogdestam et al., 1986; Lee, 1987; Thomas, 1987; Niederberger & Ross 1993; Matthews et al., 1995*). Sono stati descritti casi di ricanalizzazione e di successiva gravidanza dopo EV realizzata a livello dei coni efferenti (*Silber, 1988; Weiske, 1994*).

Lee (1987), confrontando i risultati delle epididimovasostomie realizzate con macro- e con microchirurgia, ha trovato differenze significative a favore dell'ultima.

In una serie di 60 casi (nei quali sono stati esclusi quelli post-vasectomia), la nostra equipe ha ottenuto il 58% di canalizzazioni e il 32% di gravidanze quando l'eziologia dell'ostruzione epididimaria era acquisita e il 34% di canalizzazioni e il 9% di gravidanze quando era congenita o idiopatica. Nei casi con presenza di spermatozoi nell'ejaculato ma in cui non si è ottenuta una gravidanza spontanea, si è proceduto alla ICSI e la percentuale di fertilizzazione è stata del 68% e quella di gravidanza del 29%. Quando sono stati utilizzati spermatozoi crioconservati, la percentuale di fertilizzazione è stata del 52%

e si è ottenuta una gravidanza nel 22% dei casi.

OSTRUZIONE DEFERENZIALE

Eziologia

L'ostruzione del dotto deferente è abbastanza rara e solitamente ha un'eziologia jatrogena (erniorrafie, varicoceleomie, orchidopessi o qualsiasi altro intervento chirurgico a livello inguino-scrotale). Ancor più raramente la genesi è traumatica. L'infezione del deferente è assolutamente eccezionale ed usualmente di tipo tubercolare. Raramente si possono anche trovare malformazioni congenite che abitualmente si localizzano a livello distale del dotto. Attualmente il motivo più frequente per il quale si pratica una vasovasostomia (VV) è il desiderio di recupero della fertilità da parte di uomini precedentemente sottoposti a vasectomia per scopo contraccettivo.

Diagnosi

La diagnosi di ostruzione deferenziale nei pazienti giunti alla nostra osservazione per problemi di infertilità viene formulata partendo dall'anamnesi patologica, dalla biopsia

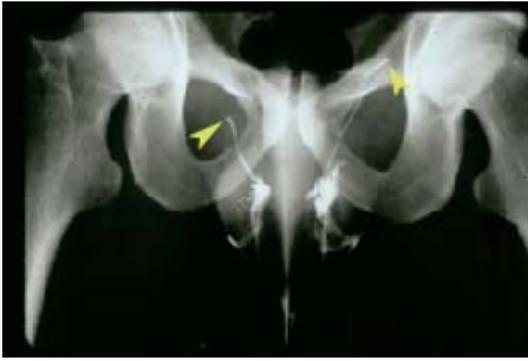


Fig. 6a: deferentovesiculografia bilaterale. Le frecce indicano il punto dell'ostruzione dei dotti deferenti. Paziente sottoposto ad ernioplastica inguinale bilaterale.



Fig. 6b: deferentovesiculografia destra. La freccia indica il punto dell'ostruzione deferenziale distale (ostruzione di natura tubercolare).

del testicolo, dove si dimostra una spermatogenesi conservata, e della deferentovesiculografia (DVG) che permette di determinare il livello dell'ostruzione (fig. 6a,b). Lo studio immunologico su siero permette di dimostrare la presenza di anticorpi anti-spermatozoo. Quando la causa dell'ostruzione deferenziale è iatrogena, può essere molto difficile localizzare l'estremità distale del dotto deferente e a volte può addirittura mancare un ampio segmento del dotto, impedendo così l'avvicinamento dei due monconi e quindi l'anastomosi. Inoltre, quando l'ostruzione è di vecchia data, capita spesso che anche l'epididimo risulti ostruito per la rottura del tubulo creata dall'iperpressione all'interno

della via seminale. In questi casi e nelle ostruzioni molto distali del deferente, si deve procedere all'aspirazione degli spermatozoi dall'estremità prossimale del deferente o dell'epididimo.

In caso di ostruzione deferenziale post-vasectomia, l'unico esame preoperatorio da praticare, oltre agli indici di emostasi, è la determinazione degli anticorpi antispermatozoi nel siero. L'esito della VV in questi casi dipende, secondo il nostro criterio, dal tipo di vasectomia praticata. La prognosi migliore si ha quando la sezione del dotto deferente è stata eseguita il più distale possibile rispetto all'epididimo, con occlusione mediante elettrocoagulazione solamente del segmento distale, lasciando libero il prossimale. In questo modo si evita la rottura da eccesso di pressione da parte del tubulo epididimario.

La VV può essere realizzata sotto anestesia locale, in regime ambulatoriale. Questa possibilità dipende unicamente dalla durata dell'intervento. Noi pratichiamo la vasovasostomia bilaterale in due strati secondo la tecnica descritta da Silber (1978a) in un tempo che varia tra 1 e 2 ore.

A livello della radice scrotale si realizza una minima incisione e si esteriorizza il deferente al livello in cui fu praticata la vasectomia, dove si apprezzano l'interruzione del dotto o la presenza del granuloma spermatico sul moncone prossimale. Si seziona trasversalmente il moncone deferenziale distale e se ne verifica la pervietà fino all'uretra mediante l'iniezione di soluzione fisiologica (si veda in dettaglio la procedura nel paragrafo relativo alla epididimovasostomia). Una volta sezionata anche l'estremità del moncone prossimale del deferente, si striscia su un vetrino portaoggetti il fluido seminale che ne fuoriesce e si valuta la concentrazione e la qualità spermatica, in accordo con la classificazione riportata nella tabella 1.

Indipendentemente dal riscontro o meno di spermatozoi, si procede ad ultimare la chirurgia ricostruttiva sotto la guida del microscopio intraoperatorio. Con l'aiuto di forbici e

di tampone si libera l'estremo deferenziale distale per evitare tensioni nell'anastomosi. Uno speciale clamp deferenziale permette di avvicinare in maniera adeguata entrambi i monconi per la sutura microchirurgica. Per meglio visualizzare i sottili fili di sutura ed i monconi deferenziali rispetto al campo operatorio circostante si può collocare sotto il suddetto clamp un pezzo di foglio di plastica colorata. Con monofilamento di nylon 9-0 si realizzano 3 punti anteriori e 3 posteriori attraverso i due strati mucosi dei lumi deferenziali. Si completa la anastomosi con vari punti attraverso lo strato muscolare in entrambe le facce del deferente (fig.7).

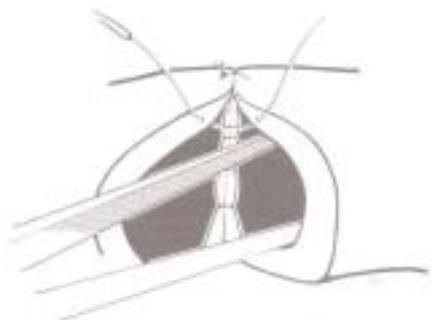


Fig. 7: vasovasostomia in due strati.

E' anche possibile realizzare la VV in un unico piano secondo la tecnica proposta da Schmidt nel 1978 (apposizione triangolare dei punti) (Fox, 1996). Noi praticiamo la VV in un piano quando la anastomosi deve essere fatta nel segmento convoluto e in tutti i casi in cui il deferente è molto sottile.

Altre tecniche proposte di VV si basano sull'utilizzo del laser (Rosemberg et al., 1985; Rosemberg et al., 1988; Shanberg et al., 1990) o sull'utilizzo della colla di fibrina (Silverstein et al., 1991).

Si lasciano drenaggi in entrambi gli emiscreti che devono essere rimossi dopo 24 ore e si consiglia l'uso del sospensorio per 1 settimana e astinenza sessuale per 20 giorni. Ad un mese dall'intervento si deve praticare il

primo spermioγραμμα. Contrariamente a quello che succede nella chirurgia ricostruttiva epididimaria, gli spermatozoi compaiono nell' eiaculato più precocemente.

Frequentemente la concentrazione e la qualità spermatica migliorano progressivamente, una volta che sono stati emessi gli spermatozoi più vecchi rimasti bloccati nell'epididimo.

Nei casi in cui non si sono riscontrati spermatozoi durante l'atto chirurgico e non compaiono nell'eiaculato dopo la chirurgia, si deve pensare ad una ostruzione epididimaria secondaria, che richiede una successiva epididimovasostomia. Meno frequentemente, dopo la comparsa di spermatozoi nell'eiaculato, si può ripresentare un quadro di azoospermia. In questo caso si deve sospettare la presenza di cicatrizzazione anomala che determina un'ostruzione di entrambi i deferenti. Nella nostra esperienza abbiamo osservato che in questi pazienti frequentemente le VV falliscono ripetutamente.

Un'altra possibilità è che compaiano pochi spermatozoi qualitativamente scadenti nell'eiaculato. In questo caso si deve prendere in considerazione la presenza di anticorpi antispermatozoo (Linnet et al., 1981) e pertanto si può tentare un trattamento corticosteroidico. Si deve comunque considerare che gli anticorpi antispermatozoo sono presenti in più del 50% dei pazienti con ostruzione deferenziale (Alexander & Anderson, 1979; Meinertz et al., 1990). Thomas et al. (1981) non hanno osservato differenze significative in termini di tasso di gravidanza post-VV confrontando i pazienti con anticorpi vs. quelli senza anticorpi.

Un'altra spiegazione possibile in merito all'oligozoospermia è la riostruzione parziale del deferente e la possibile lesione neurologica locale indotta dalla vasectomia o dalla successiva chirurgia ricostruttiva, con riduzione della contrazione del deferente e quindi difficoltosa propulsione del liquido spermatico (Pabst et al., 1979). Di recente alcuni ricercatori hanno ipotizzato che una scadente

qualità seminale post-vasovasostomia vada imputata alla presenza di radicali liberi dell'ossigeno prodotti dai leucociti o dagli spermatozoi stessi (*Shapiro et al., 1998; Kolettis et al., 1999*).

Se poi non si ottengono gravidanze naturali, si può suggerire l'impiego di tecniche di fecondazione assistita a bassa o ad alta tecnologia, in funzione dei risultati della preparazione biologica del seme.

In un'alta percentuale di pazienti nei quali non si sono riscontrati spermatozoi durante l'atto chirurgico, o in quelli in cui si sono osservate solo teste di spermatozoi, si riscontrano spermatozoi normali nell'eiaculato dopo la VV (*Sharlip, 1982*). Questo è il motivo per il quale si consiglia di praticare sempre la VV, indipendentemente dal riscontro o meno di spermatozoi durante l'atto chirurgico.

Il tasso di successo della VV è inversamente correlato al tempo intercorso dalla vasectomia. Tuttavia noi riteniamo che il fattore prognostico più importante rimanga il livello al quale è stato sezionato il deferente.

Nella tabella 3 vengono riportati i risultati delle casistiche più ampie di VV (*Fenster & McLoughlin, 1981; Cos et al., 1983; Owen & Kapila, 1984; Soonawalla & Lal, 1984; Lee, 1986; Silber, 1989; Matthews et al., 1995*). La percentuale di comparsa degli spermatozoi nel seme dopo la chirurgia oscilla tra il 75% ed il 99%, e quella di ottenimento di una gravidanza tra il 46% e l'82%. La serie

più ampia pubblicata è quella del Vasovasostomy Study Group (*Belker et al., 1991*). In 1247 VV si è ottenuta la ricanalizzazione e la gravidanza rispettivamente nell'86% e 52% dei casi. Nei 222 casi della stessa serie in cui si è praticata la VV per la seconda volta, gli spermatozoi sono comparsi nel seme nel 75% dei casi, e nel 43% delle coppie si è ottenuta una gravidanza. Questo studio dimostra risultati differenti in relazione al tempo trascorso dalla vasectomia. Quando la vasectomia era stata praticata in un periodo inferiore a tre anni, la percentuale di comparsa degli spermatozoi nel seme e quella di gravidanza era del 99% e del 76% rispettivamente. Al di sopra dei 15 anni si è dimostrata la presenza di spermatozoi nel seme nel 71% dei casi e di gravidanza nel 30% dei casi. Quando non si sono riscontrati spermatozoi nel moncone prossimale dei dotti deferenti, il tasso di ricanalizzazione risultava pari al 60% e quello di gravidanza al 31%.

Lee (1986), in accordo con il Vasovasostomy Study Group, non ha trovato differenze significative nei risultati delle VV realizzate in uno o in due strati.

In una nostra casistica relativa a 102 pazienti (età media 37 anni, range 25-54 anni) che hanno richiesto una VV post-vasectomia, i motivi del desiderio di recupero della fertilità erano il cambio di partner (53%), il desiderio di altri figli nell'ambito della stessa coppia

AUTORE	/	ANNO	N°	RICANALIZZAZIONI(%)	GRAVIDANZE(%)
FENSTER		1981	26	96	54
COS		1983	87	75	46
OWEN		1984	475	93	82
SOONAWALLA		1984	339	89	63
LEE		1986	185	91	52
SILBER		1989	282	91	81
BELKER		1991	1247	86	52
MATTHEWS		1995	100	99	52

Tavola 3 : Risultati della vaso-vasostomia microchirurgica

(26,4%), la morte del figlio (7,8%) e la vasectomia praticata prima del matrimonio (7,8%). La qualità del liquido spermatico dal moncone deferenziale prossimale era di grado 1 nel 22% dei pazienti, di grado 2 nel 32%, di grado 3 nel 17%, di grado 4 nell'11% e di grado 5 nel 18%.

Settantatré pazienti sono stati valutati a distanza. Nel 93,2% di essi si è ottenuta la ricanalizzazione delle vie seminali ed una gravidanza nel 40% delle coppie. Nel 92,3% dei pazienti che presentavano un liquido spermatico deferenziale di grado 5 durante la VV, si è riscontrata la presenza di spermatozoi nell'eiaculato dopo la chirurgia.

CHIRURGIA RICOSTRUTTIVA CROCIATA

In determinate occasioni è necessario utilizzare determinati segmenti di entrambe le vie seminali per ottenere la pervietà di una sola di queste. Quando si ha un testicolo con patologia secretoria ed una via seminale conservata, ed il testicolo controlaterale è normale ma con una ostruzione a livello del deferente distale o del dotto eiaculatore, può essere praticata l'anastomosi crociata tra il deferente del testicolo sano ed il deferente del testicolo alterato (VV crociata) (*Lizza et al., 1985*). Un altro esempio in cui applicare una ricanalizzazione crociata è quello della agenesia unilaterale del deferente con un testicolo sano e quello controlaterale alterato, ma con via seminale distale normale. In questo caso può essere praticata l'anastomosi tra l'epididimo con agenesia ed il deferente controlaterale (EV crociata). Nei 10 pazienti sottoposti da *Sabanegh e Thomas (1995)* ad EV crociata per differenti cause, si è ottenuta la ricanalizzazione nell'89% e la gravidanza nel 28,5%.

CHIRURGIA RICOSTRUTTIVA NELLA OLIGOZOOSPERMIA

Alcune forme di oligozoospermia sono documentabili in pazienti affetti da ostruzione completa monolaterale e patologia secretoria controlaterale. La diagnosi di una oligo-

zoospermia escretoria si pone sulla scorta dell'anamnesi patologica, della esplorazione chirurgica dell'epididimo, della biopsia testicolare e della deferentovesiculografia. Quest'ultima è indicata quando il volume seminale risulta ridotto e quando esistono precedenti che possano aver determinato una ostruzione deferenziale (erniorrafia, orchidopessia, etc.). Per la corretta diagnosi dell'oligozoospermia escretoria è necessario praticare uno studio quantitativo degli spermatozoi maturi, come suggerito da *Silber & Rodríguez-Rigau (1981)*. Se il numero di spermatozoi maturi è nettamente superiore al numero degli spermatozoi dell'eiaculato, l'oligozoospermia deve essere classificata come ostruttiva.

Dato che in queste coppie è possibile eseguire la ICSI con gli spermatozoi eiaculati, sorge spontaneo l'interrogativo se valga la pena di ricorrere alla chirurgia ricostruttiva o disostruttiva. Secondo il nostro parere, quest'ultima sarebbe indicata in caso di astenozoospermia totale o quando per qualsiasi motivo non si possa procedere alla ICSI.

In una casistica di 16 pazienti oligozoospermici nei quali la maggioranza delle ostruzioni era localizzata a livello dell'epididimo *Hauser et al. (1995)* hanno osservato dopo la ricostruzione microchirurgica un incremento della concentrazione e della motilità spermatica in 8 pazienti (50%), nessuna variazione in 5 (31%) e la scomparsa degli spermatozoi nell'eiaculato (azoospermia) in 3 (19%). Due degli 8 pazienti che sono migliorati hanno ottenuto una gravidanza spontanea (12,5%).

BIBLIOGRAFIA

Alexander NJ & Anderson DJ.

Vasectomy: consequences of autoimmunity to sperm antigens. *Fertil Steril* 32: 253, 1979.

Belker A, Thomas Jr. AJ, Fuchs EF, Konnak JW, Sharlip ID.

Results of 1469 microsurgical vasectomy reversals by the vasovasostomy study group. *J Urol* 145: 505-511, 1991.

Belker AM.

Vasography and techniques for epididymal microsurgery. *Urol Times* 22: 8, 1994.

Cos LR, Valvo JR, Davis RS, Cockett ATK.

Vasovasostomy: current state of the art. *Urology* 22:567-575, 1983.

Dubin L & Amelar RD.

Magnified surgery for epididymostomy. *Urology*, 23: 525, 1984.

Wagenknecht LV.

Ten years experience with microsurgical epididymostomy: results and proposition of a new technique. *J Androl* 6: 26, 1985.

Fenster H & McLoughlin MG.

Vasovasostomy: is the microscope necessary? *Urology* 28: 60-64, 1981.

Fogdestam I, Fall M, Nilsson S.

Microsurgical epididymovasostomy in the treatment of occlusive azoospermia. *Fertil Steril* 46: 925, 1986.

Fox M.

Easing the technical difficulty of microscopic vasectomy reversal. *Br J Urol* 78: 462-463, 1996.

Hauser R, Temple-Smith PD, Southwick GJ, McFarlane J, de Kretser DM.

Pregnancies after microsurgical correction of partial epididymal and vasal obstruction. *Hum Reprod*, 10:1152-1155, 1995.

Jarow JP, Sigman M, Buch JP, Oates RD.

Delayed appearance of sperm after end-to-side vasoepididymostomy. *J Urol* 153: 1156-1158, 1995.

Jarvi K, Zielensky J, Wilschanski M, Durie P, Tullis E, Markiewicz D, Tsui LC.

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. *Lancet* 345: 1578, 1995.

Jarvi K, Zini A, Buckspan MB, Asch M, Ginzburg B, Margolis M.

Adverse effects on vasoepididymostomy outcomes for men with concomitant abnormalities in the prostate and seminal vesicle. *J Urol* 160: 1410-1412, 1998.

Kolettis PN, Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson D, Thomas Jr AJ, Agarwal A.

Effect of seminal oxidative stress on fertility after vasectomy reversal. *Fertil Steril* 71: 249-255, 1999.

Lee HY.

Twenty years' experience with vasovasostomy. *J Urol* 136: 413, 1986.

Lee HY.

A 20-year experience with epididymovasostomy for pathologic epididymal obstruction. *Fertil Steril* 47: 487-491, 1987.

Linnet L.

Association between failure to impregnate after vasovasostomy and sperm agglutinins in semen. *Lancet* 1: 117, 1981.

Lizza EF, Marmar JL, Belker AM, Nagler HM.

Transseptal crossed vasovasostomy. *J Urol* 134: 1131-1132, 1985

Marmar JL.

Management of the epididymal tubule during an end-to-side vasoepididymostomy. *J Urol* 154:93-96,1995.

Marmar JL.

Modified vasoepididymostomy with simultaneous double needle placement, tubulotomy and tubular invagination. *J Urol* 163: 483-486, 2000.

Matsuda T, Horii Y, Mugeruma K.

Microsurgical epididymovasostomy for obstructive azoospermia: factors affecting postoperative fertility. *Eur Urol* 26: 322-326, 1994.

Matthews GJ, Schlegel PN, Goldstein M.

Patency following microsurgical vasoepididymostomy and vasovasostomy: temporal considerations. *J Urol* 154: 2070-2073, 1995.

McLoughlin MG.

Vasoepididymostomy: the role of the microscope. *Can J Surg* 25:41, 1982.

Meinertz H, Linnet L, Fogh-Andersen P, Hjort T.

Antisperm antibodies and fertility after vasovasostomy: a follow-up study of 216 men. *Fertil Steril* 54:315, 1990.

Niederberger C & Ross LS.

Microsurgical epididymovasostomy: predictors of success. *J Urol* 149: 1364-1367, 1993.

Owen E & Kapila H.

Vasectomy reversal: review of 475 microsurgical vasovasostomies. *Med J Aust* 140: 398-400, 1984.

Pabst R, Martin O, Lippert H.

Is the low fertility rate after vasovasostomy caused by nerve resection during vasectomy? *Fertil Steril* 31: 316-320, 1979.

Pomerol JM.

Práctica microquirúrgica. In: *Práctica andrológica*. JM Pomerol & JL Arrondo (eds), pp. 282-298. Masson-Salvat, 1994a.

Pomerol JM.

Microcirugía del epidídimo. In: *Práctica andrológica*. JM Pomerol & JL Arrondo (eds), pp. 299-318. Masson-Salvat, 1994b.

Rosemberg SK .

Carbon dioxide laser microsurgical vasovasostomy. *Urology* 25: 53, 1985.

Rosemberg SK.

Further clinical experience with CO2 laser in microsurgical vasovasostomy. *Urology* 32: 225, 1988.

Ruiz-Romero J, Sarquella J, Pomerol JM.

A new device for microsurgical sperm aspiration. *Andrologia* 26: 119-120, 1994.

Sabaneg E & Thomas A J.

Effectiveness of crossover transseptal vasoepidymostomy in treating complex obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 63: 392-395, 1995.

Schlegel PN & Goldstein M.

Microsurgical vasoepidymostomy: refinements and results. *J Urol* 150: 1165-1168, 1993.

Schmidt SS.

Vasovasostomy. *Urol Clin North Am* 5: 585, 1978

Shanberg A, Tansey L, Baghdassarian R, Sawyer D, Lynn C.

Laser-assisted vasectomy reversal: experience in 32 patients. *J Urol* 143: 528, 1990.

Shapiro RH, Muller CH, Chen G, Berger RE.

Vasectomy reversal associated with increased reactive oxygen species production by seminal fluid leukocytes and sperm. *J Urol* 160: 1341-1346, 1998.

Sharlip ID.

The significance of intravasal azoospermia during vasovasostomy: answer to a surgical dilemma. *Fertil Steril* 38: 496, 1982.

Silber SJ.

Vasectomy and vasectomy reversal. *Fertil Steril* 29: 125-140, 1978a.

Silber SJ.

Microscopic vasoepidymostomy: specific microanastomosis to the epididymal tubule. *Fertil Steril* 30: 565-571, 1978b.

Silber SJ & Rodríguez-Rigau L.

Quantitative analysis of testicle biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery for obstruction. *Fertil Steril* 36:480, 1981.

Silber SJ.

Pregnancy caused by sperm from vasa efferentia. *Fertil Steril* 49: 373-375, 1988.

Silber SJ.

Pregnancy after vasovasostomy for vasectomy reversal: a study of factors affecting long-term return of fertility in 282 patients followed for 10 years. *Hum Reprod* 4:318-322, 1989.

Silverstein JI & Mellinger BC.

Fibrin glue vasal anastomosis compared to conventional sutured vasovasostomy in the rat. *J Urol* 145: 1288, 1991.

Soonawalla FB & Lal SS.

Microsurgery in vasovasostomy. *Indian J Urol* 1:104-108, 1984.

Thomas AJ, Pontes JE, Rose NR, Segal S, Pierce JM.

Microsurgical vasovasostomy: immunologic consequences and subsequent fertility. *Fertil Steril* 35: 447- 450, 1981.

Thomas AJ Jr.

Vasoepidymostomy. *Urol Clin N Amer*, 14: 527, 1987.

Young D.

Surgical treatment of male infertility. *J Reproduct Fertil* 23: 541-542, 1970.

Wagenknecht LV, Klosterhalfen H, Schirren C.

Microsurgery in andrologic urology. I. Refertilization. *J Microsurg* 1: 470, 1980.

Weiske WH.

Pregnancy caused by sperm from vasa efferentia. *Fertil Steril* 62: 642-643, 1994.

RECUPERO CHIRURGICO DEGLI SPERMATOZOI : CHE METODO UTILIZZARE?

Peter N. Schlegel

Center for Male Reproductive Medicine and Microsurgery, Cornell University - Weill Medical College
(New York)

Introduzione

Nel corso degli ultimi cinque anni pochi settori della medicina moderna sono cambiati così drasticamente come la medicina della riproduzione, specialmente per quanto riguarda il nuovo trattamento dell'infertilità maschile che ha potuto beneficiare

- 1) dell'iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI) (*Palermo et al., 1992*)
- 2) di avanzate tecniche chirurgiche di recupero di spermatozoi epididimari e testicolari (*Girardi & Schlegel, 1996; Girardi et al., 1997; Schlegel & Su, 1997; Sheynkin & Schlegel, 1997*).

Questi due principali progressi tecnici hanno profondamente modificato il trattamento delle azoospermie non-ostruttive (= secretorie) e di quelle ostruttive già considerate incurabili.

Prima di procedere al recupero chirurgico degli spermatozoi dal testicolo o dall'epididimo, andrebbe effettuata un'analisi preliminare della partner, al fine di accertare che abbia un'adeguata riserva ovarica per sottoporsi alla procedura IVF-ICSI.

Nei pazienti azoospermici con volume seminale ridotto (<1ml), dovrebbe essere effettuata una ricerca degli spermatozoi nelle urine post-eiaculazione, al fine di escludere un'eiaculazione retrograda.

E' assolutamente necessaria un'anamnesi accurata per individuare fattori etiopatogenetici che possono aver condotto all'azoospermia, come il criptorchidismo, interventi di ernia inguinale bilaterale, o casi familiari di fibrosi cistica.

Un uomo con un passato di criptorchidismo ed un volume testicolare di 8 ml molto probabilmente avrà un'azoospermia non ostruttiva (NOA), mentre un paziente con agenesia deferenziale, con un volume testicolare di 16 ml o più ed una testa dell'epididimo dilatata quasi sicuramente avrà un'azoospermia ostruttiva. L'esame obiettivo dovrebbe anche essere condotto con particolare attenzione al volume dei testicoli (il normale riscontro è superiore a 15 ml), alla presenza di dilatazione epididimaria, che indica ostruzione, e all'esistenza del dotto deferente.

Il testicolo dovrebbe essere esaminato attentamente per verificare l'esistenza di tumori, causa non rara di azoospermia e la più diffusa forma neoplastica negli uomini di età compresa tra i 15 e i 45 anni.

Una indagine complementare, quale l'ecografia transrettale, può costituire un aiuto nel determinare la presenza di un'ostruzione del dotto eiaculatore. L'ecocolordoppler scrotale può servire ad individuare piccoli tumori al testicolo in uomini con masse scrotali o una storia di criptorchidismo (Tabella 1).

Tab. 1 : Protocollo diagnostico della azoospermia

1 Spermioogrammi ripetuti

- (con centrifugazione ed esame del pellet cellulare)

2 Anamnesi completa

3 Esame obiettivo

4 Dosaggi ormonali

- Ormone follicolo-stimolante (FSH)
- Testosterone (T)

5 Esami complementari

- Esame dell'urina post-eiaculazione
- Ecografia transrettale
- Ecografia scrotale

*Versione italiana a cura di
Luciano Negri & Guido Piediferro*

Inquadramento clinico dell'azoospermia

Prima di iniziare il trattamento in una coppia nella quale l'uomo sia affetto da azoospermia, è necessario stabilire se si tratti di una forma secretoria (**NOA**) od ostruttiva (**OA**), ovviamente dopo aver escluso la presenza di una eiaculazione retrograda, frequente nei diabetici. Infatti, in questi casi, non sono necessarie procedure invasive per il recupero dei gameti che possono essere isolati dalle urine raccolte dopo orgasmo.

Va esclusa anche una anejaculazione, spesso presente nei paraplegici, che può essere trattata mediante stimolazione vibratoria del pene o elettroeiaculazione.

L'azoospermia non-ostruttiva è una condizione che si verifica quando nell'eiaculato non sono presenti spermatozoi, per una grave alterazione della spermatogenesi.

La maggior parte degli uomini affetti da NOA ha testicoli piccoli, un FSH elevato ed epididimi vuoti.

In queste condizioni, la biopsia del testicolo rivelerà una produzione alterata di spermatozoi. I quadri istologici generalmente individuati in questi casi sono la Sindrome a Sole Cellule di Sertoli, l'arresto maturativo e l'ipospematogenesi (Jow *et al.*, 1993; Ostad *et al.*, 1998).

La **Sindrome a Sole Cellule di Sertoli (SCOS)** è una condizione che si verifica quando nei tubuli seminiferi sono presenti solo le cellule di supporto (cellule di Sertoli), senza cellule germinali.

Nell'**Arresto maturativo** i tubuli seminiferi risultano rivestiti da cellule germinali che non raggiungono la completa differenziazione fino allo spermatozoo.

L'**ipospematogenesi** si caratterizza per un difetto quantitativo delle cellule della linea germinativa che comunque arrivano a maturazione completa.

Quando si abbia una buona esperienza clini-

ca, l'anamnesi e l'esame obiettivo possono già orientare verso la genesi dell'azoospermia. Per esempio, la presenza di testicoli di volume normale, con epididimi induriti e/o l'assenza dei dotti deferenti condurrà ad una diagnosi di OA.

Una storia di criptorchidismo in presenza di testicoli piccoli e di consistenza ridotta indirizzerà verso una NOA, specialmente quando l'FSH risulta elevato (tabella 2).

Tab. 2 : Caratteristiche diagnostiche della NOA

1 Anamnesi

- Criptorchidismo, chemioterapia, anomalie genetiche.

2 Esame obiettivo

- Testicoli piccoli (<15 ml.) e/ o di consistenza ridotta; epididimo vuoto.

3 Spermioγραμμα

- Volume normale, presenza di fruttosio, spermatozoi assenti

4 Dosaggi ormonali

- FSH alto
- Testosterone al limite inferiore
- Estradiolo al limite superiore

La distinzione tra OA e NOA è di fondamentale importanza in quanto i pazienti con patologia ostruttiva possono avere diverse alternative efficaci per il trattamento, quale la ricostruzione microchirurgica delle vie seminali. Al contrario, nei pazienti affetti da NOA esiste un elevato rischio di non riuscire a recuperare chirurgicamente spermatozoi testicolari per l'esecuzione della ICSI, e pertanto le coppie devono essere informate di tale rischio prima di accedere ad un programma di fecondazione assistita. Non bisogna poi dimenticare che molte forme di NOA sono secondarie ad una anomalia cromosomica, che pertanto anche nel caso di recupero di spermatozoi testicolari, potrebbe impedire la fertilizzazione degli oociti. Anche alcune forme di OA possono essere associate ad una anomalia genetica. La più frequente, vale a dire l'agenesia dei dotti deferenti, risulta secondaria a mutazioni del gene della fibrosi cistica (CFTR).

Qualità degli spermatozoi nell'azoospermia ostruttiva e non-ostruttiva

In condizioni normali gli spermatozoi, una volta fuoriusciti dal testicolo, sono praticamente privi di motilità ed hanno una limitata capacità fecondante. Tali proprietà vengono progressivamente acquisite durante il loro transito nell'epididimo e si completano a livello della porzione caudale dell'organo.

Questo fenomeno risulta totalmente sovvertito nelle OA secondarie ad ostruzione acquisita o congenita dell'epididimo, dove si osserva una migliore qualità degli spermatozoi nel tratto prossimale dell'organo e viceversa (Fig. 1).

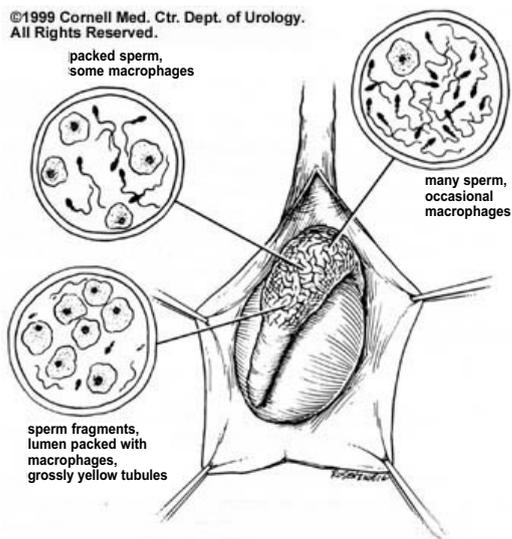


Fig.1 : Reperti citologici nella ostruzione epididimaria

Questo fenomeno di **"motilità inversa"** si presume esser proprio delle vie seminali ostruite. Gli spermatozoi sono infatti continuamente prodotti dai testicoli e riassorbiti nella porzione distale degli epididimi ostruiti. A tale livello i tubuli epididimari appaiono solitamente molto dilatati, gialli, e nel loro lume sono presenti numerosi macrofagi che fagocitano gli spermatozoi degenerati dopo una lunga permanenza nella via seminale

ostruita (Schlegel et al., 1994). Pertanto, il recupero degli spermatozoi dovrebbe essere effettuato nei tubuli epididimari prossimali o eventualmente dal testicolo, essendo ivi maggiori le probabilità di ottenere spermatozoi vitali o addirittura mobili. Non infrequentemente infatti nel fluido tubulare prossimale dell'epididimo ostruito abbiamo trovati almeno un milione di spermatozoi mobili per microlitro.

Nelle NOA gli spermatozoi possono essere recuperati chirurgicamente solo dal testicolo. Spesso essi risultano immobili o presentano una debole motilità oscillatoria. Normalmente, dopo diverse ore di incubazione in vitro, gli spermatozoi testicolari immobili acquisiscono una modesta motilità. La mancanza di mobilità iniziale non riflette infatti necessariamente una mancanza di vitalità degli spermatozoi testicolari, poiché questi non la hanno mai acquisita. Per contro, gli spermatozoi immobili presenti nell'eiaculato hanno acquisito e poi perso la mobilità (e la vitalità), diventando così inutilizzabili per la ICSI.

Un volume testicolare ridotto e un FSH elevato sono considerati usualmente prognostici di NOA, e pertanto di scarsa probabilità di recuperare chirurgicamente spermatozoi dal testicolo. Non esistono tuttavia criteri predittivi assoluti attraverso i quali si possano selezionare i pazienti nei quali sia possibile ottenere spermatozoi mediante estrazione chirurgica testicolare (TESE). Neppure i quadri istologici di Sindrome a Sole Cellule di Sertoli, o di arresto maturativo, o di ipospermatogenesi possono predire perfettamente la possibilità di trovare spermatozoi mediante TESE. Tuttavia molti Centri richiedono biopsie diagnostiche prima di applicare le procedure TESE, al fine di escludere la presenza di un carcinoma in situ (neoplasia intratubulare), presente almeno nel 3% degli uomini affetti da NOA, in attesa di trattamento mediante TESE-ICSI (Ostad et al., 1998).

solitamente manca materiale genetico in uomini affetti da NOA. *Il riscontro di delezioni del cromosoma Y, e in particolare della regione AZFb (come è possibile osservare nei pazienti siglati SMG32, SMG78, SMG126), ha valore prognostico, perché indica un elevato rischio di fallimento nel prelievo chirurgico di spermatozoi testicolari (Girardi et al., 1997).*

Altre anomalie cromosomiche, individuabili con il cariotipo, sono frequenti nei pazienti affetti da NOA, e possono essere trasmesse alla progenie mediante le procedure ICSI. *Quando vengano trovate anomalie genetiche, la coppia candidata alla fecondazione assistita dovrebbe essere informata del rischio di trasmissione dell'anomalia genetica alla progenie e del rischio di fallimento della fertilizzazione.*

Poiché in circa la metà dei pazienti affetti da NOA non è possibile recuperare spermatozoi testicolari, dovrebbe essere presa in considerazione la possibilità di utilizzare gli spermatozoi di un donatore. In molti casi la coppia si dimostra scettica nei riguardi di questa possibilità, ed il parere di uno psicologo può esserle d'aiuto a rivedere le implicazioni derivanti dall'aver un figlio che non sia geneticamente connesso al padre.

Tecniche di recupero degli spermatozoi

Il recupero chirurgico degli spermatozoi è indicato nelle OA quando la ricanalizzazione microchirurgica risulti difficoltosa o impossibile.

Gli obiettivi del recupero chirurgico degli spermatozoi sono:

- 1) *ottenimento di gameti di ottima qualità e*
- 2) *in quantità adeguata, sia per un utilizzo immediato sia per la crioconservazione,*
- 3) *minimizzando i danni sul tratto riproduttivo in modo da non compromettere eventuali successivi recuperi di spermatozoi o ricostruzioni microchirurgiche.*

Recupero di spermatozoi nelle OA

1) Aspirazione testicolare con ago sottile: la Testicular Fine-Needle Aspiration (TeFNA) è stata inizialmente descritta come procedura diagnostica alternativa alla biopsia escissionale. Successivamente è stata utilizzata per recuperare spermatozoi da utilizzare per fecondazione assistita (Sheynkin et al., 1998; Schlegel, 1999b).

La puntura percutanea del testicolo può essere effettuata con un ago 21-23G, collegato ad una siringa da 20 cc, in un portasiringa di Menghini (Fig. 3). In alternativa, l'agobiopsia testicolare percutanea può essere effettuata con una pistola automatica per biopsia. Il limitato numero di esperienze pubblicate fino ad oggi rende difficoltosa una valutazione critica della TeFNA, sebbene appaia evidente dalla nostra esperienza che: 1) nei pazienti affetti da OA il recupero degli spermatozoi è routinariamente possibile; 2) con questa tecnica è possibile che si verifichino occasionalmente ematoceli ed ematomi testicolari. I vantaggi delle tecniche di aspirazione percutanea sono l'eseguitabilità in anestesia locale, senza dover ricorrere ad una scrototomia o a procedure microchirurgiche.

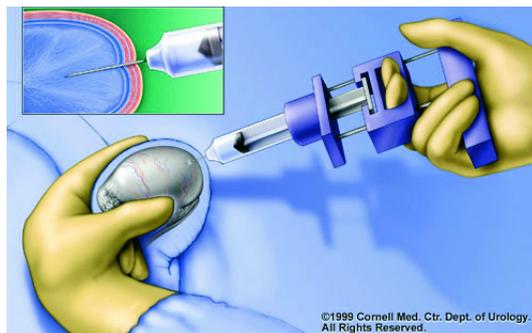


Fig. 3 : TeFNA

2) Aspirazione percutanea di spermatozoi epididimari (PESA): questa procedura non richiede l'esplorazione chirurgica dello scroto, l'uso di microscopio operatorio o una esperienza in microchirurgia. E' inoltre ripeti-

bile e poco costosa. L'aspirazione può essere effettuata in anestesia locale o generale. Dopo aver bloccato la testa dell'epididimo tra il pollice e l'indice, vi si inserisce un ago a farfalla 21G, connesso ad una siringa da 20 ml. Si comincia quindi ad aspirare, muovendo delicatamente l'ago fino a quando non si vede comparire del liquido epididimario nel tubicino dell'ago a farfalla (Fig.4). La procedura è ripetuta fino ad ottenere una quantità sufficiente di fluido. La PESA fornisce una quantità molto piccola di fluido epididimario ed è frequente la contaminazione con cellule ematiche. Nel 10-20% dei casi in cui non si aspirano spermatozoi, è possibile ricorrere al prelievo "a cielo aperto" oppure alla TeFNA.

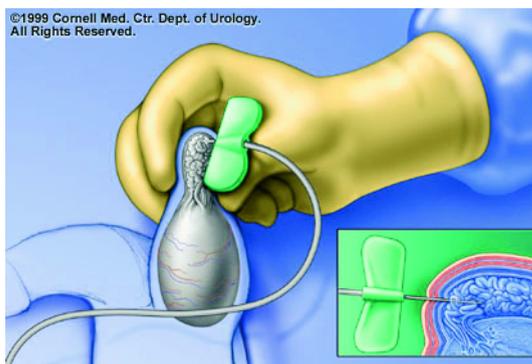


Fig. 4 : PESA

3) Biopsia percutanea del testicolo: in base alla nostra esperienza alla Cornell University (Girardi et al., 1997 ; Schlegel, 1999b) il recupero mediante biopsia percutanea è una tecnica efficace, che fornisce un elevato numero di spermatozoi in caso di OA. Una pistola automatica per biopsia 14G, con un'escursione di 1 cm (Microvasive ASAP Channel cut Biopsy system, Boston, MA, USA) è utilizzata per rimuovere un piccolo frammento di parenchima testicolare in anestesia locale (Fig. 5).

4) Aspirazione microchirurgica di spermatozoi epididimari (MESA): si tratta di un vero e proprio intervento microchirurgico. I singoli tubuli dell'epididimo sono isolati e viene effettuata un'aspirazione mediante

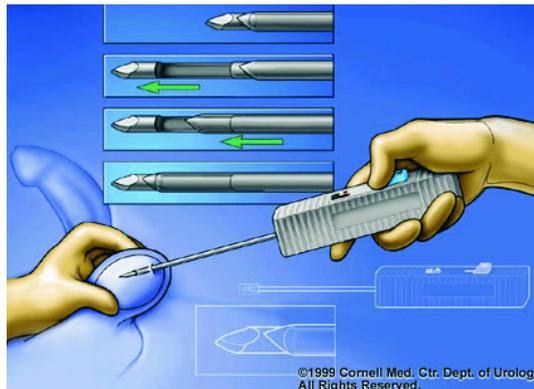


Fig. 5 : Biopsia percutanea

micropuntura (Fig. 6). Quest'approccio ha il vantaggio di consentire il recupero di un gran numero di spermatozoi epididimari, che possono essere facilmente crioconservati per successivi tentativi di fecondazione assistita. Poiché il metodo MESA comporta il recupero diretto degli spermatozoi dai tubuli epididimari, esso minimizza la contaminazione ematica del fluido epididimario, che influisce negativamente sulla capacità di fecondazione degli spermatozoi in vitro.

La tecnica MESA è effettuata con una pipetta di vetro siliconato per micropuntura, collegata ad un tubo sterile in silicone, connesso ad un apparecchio aspiratore, formato da una siringa di plastica da 1 ml per tubercolina e una siringa di vetro da 10 ml. La punta

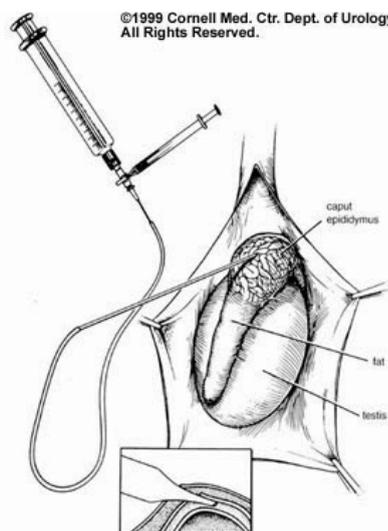


Fig. 6 : MESA

affilata della pipetta, di circa 250/350 μm , permette una agevole penetrazione nei tubuli epididimari (Schlegel et al., 1994; Sheynkin et al., 1998; Schlegel, 1999b). Alla Cornell University è stato ideato e realizzato un sistema di supporto della micropipetta, regolabile con un angolo di 180°, il MESA-Holder (Patent pending, Cornell Research Foundation, 1997)(Fig. 7), che semplifica la procedura di recupero degli spermatozoi epididimari mediante micropuntura. Con una delicata aspirazione, il fluido epididimario passa dalla micropipetta in una siringa di plastica attraverso il tubo di silicone. Quando non si trovano spermatozoi di buona qualità, andranno effettuate punture del tubulo epididimario sempre più prossimali. Le aperture create nei tubuli sono poi chiuse con sutura in nylon 9-0, oppure cauterizzate, e la tunica epididimaria chiusa con sutura in polipropilene 6-0.

Gli spermatozoi epididimari possono anche essere recuperati attraverso l'apertura di un singolo tubulo epididimario con un microbisturi, raccogliendo il fluido epididimario con una semplice micropipetta capillare, durante l'intervento di ricanalizzazione microchirurgica dell'epididimo (Matthews & Goldstein, 1996).

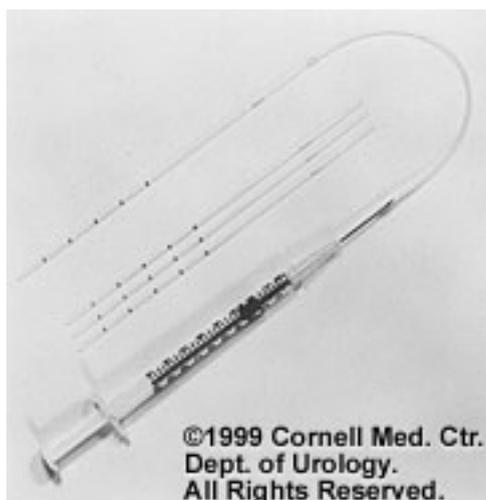


Fig. 7 : MESA - Holder

Ciò consente un'immediata conferma visiva ed una quantificazione degli spermatozoi contenuti nel fluido epididimario recuperato. Si tratta per-

tanto di una tecnica semplice, economica e sicura di recupero degli spermatozoi. Lo strumento utilizzato consiste in una siringa da 10 ml, collegata ad una micropipetta a punta smussa attraverso un tubo in silicone lungo 4-6 cm. Ogni recupero di fluido epididimario va immediatamente esaminato a 200 x con un microscopio a contrasto di fase, per valutare la concentrazione e la motilità degli spermatozoi e il grado di contaminazione da emazie. Generalmente si aspirano solo pochi microlitri di fluido epididimario, poiché gli spermatozoi in quest'ultimo sono molto concentrati (circa 1×10^6 spz/ μl), e comunque sufficienti sia per un utilizzo a fresco che per crioconservazione.

Nella nostra esperienza alla Cornell University il recupero di spermatozoi con la MESA risulta possibile nel 99% dei pazienti affetti da OA, anche in caso di pregresse e ripetute scrototomie.

Inizialmente gli spermatozoi da MESA venivano utilizzati per eseguire le prime tecniche di micromanipolazione (come la *partial zona dissection*). Attualmente gli spermatozoi epididimari vengono usati per la ICSI.

Cicli	76
Tasso di fertilizzazione	80% (665/833)
Gravidanze cliniche	75% (57/76)
Gravidanze in corso/a termine	64% (49/76)

Tab 4 : MESA-ICSI: Cornell Experience (1998)

La MESA applicata alla ICSI fornisce ottimi tassi di fertilizzazione e di gravidanza (tab. 4), grazie anche al ricorso alla tecnica di immobilizzazione meccanica degli spermatozoi prima dell'iniezione intraovocitaria, che ne aumenta la permeabilità della membrana plasmatica e fa migliorare la capacità di fertilizzare gli ovociti (Palermo et al., 1996; Schlegel, 1999a).

Alla Cornell sono state confrontate l'efficacia e l'affidabilità del recupero di spermatozoi mediante MESA, TeFNA ed agobiopsia percutanea testicolare in pazienti con OA.

I risultati indicano che la MESA è il metodo

migliore di recupero di spermatozoi in termini di numero (MESA 15×10^6 spz/ μ l vs. TeFNA $0,014 \times 10^6$ vs. biopsia percutanea del testicolo $0,116 \times 10^6$) e di motilità (MESA 15% vs. TeFNA 0% vs. biopsia percutanea del testicolo 2%).

Tab. 5: Tecniche chirurgiche per il recupero di spermatozoi testiculari nella NOA

- Biopsia standard (singola o multipla)
- Biopsia percutanea
- Microdissezione dei tubuli testiculari

Recupero di spermatozoi nelle NOA

In molti pazienti affetti da NOA possono essere estratti spermatozoi dalla polpa testicolare. La tecnica ottimale di estrazione di spermatozoi dovrebbe essere:

- 1) efficace in termini di recupero
- 2) minimamente invasiva
- 3) priva di rischi per la funzione testicolare.

1) Biopsia testicolare standard (unica o multipla) e biopsia percutanea del testicolo

La biopsia testicolare standard si effettua tramite scrototomia in anestesia locale o generale. Si incide la tunica albuginea e si rimuove un unico cospicuo frammento di polpa testicolare. In alter-

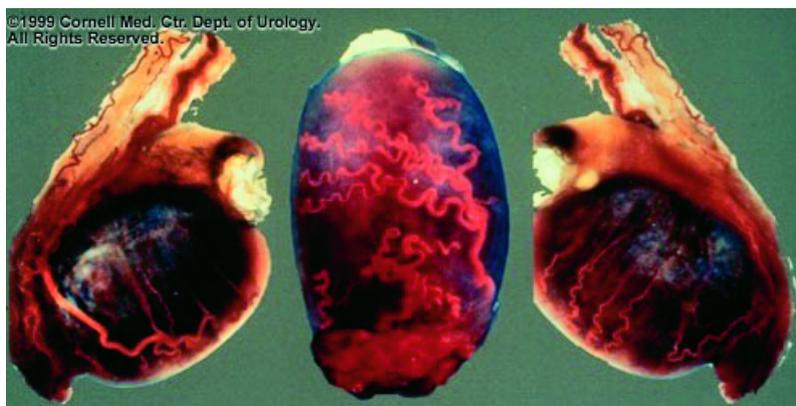
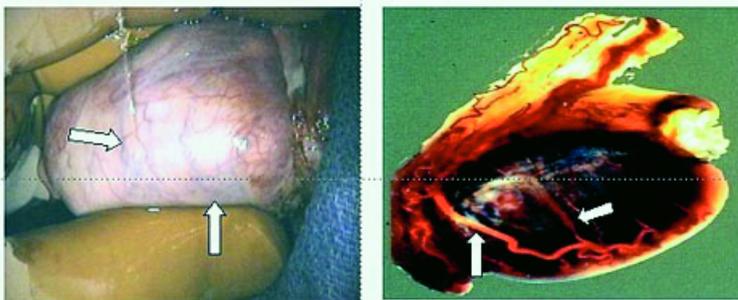


Fig. 8 : Vascolarizzazione testicolare
(da JP. Jarow, con la sua autorizzazione).

Identification of Testicular Vessels



Subtunicular arterial vessels, 10x

Fig. 9: Identificazione di vasi testiculari :
vasi arteriosi subtuniculari, 10x

Microsurgical Testis Biopsy

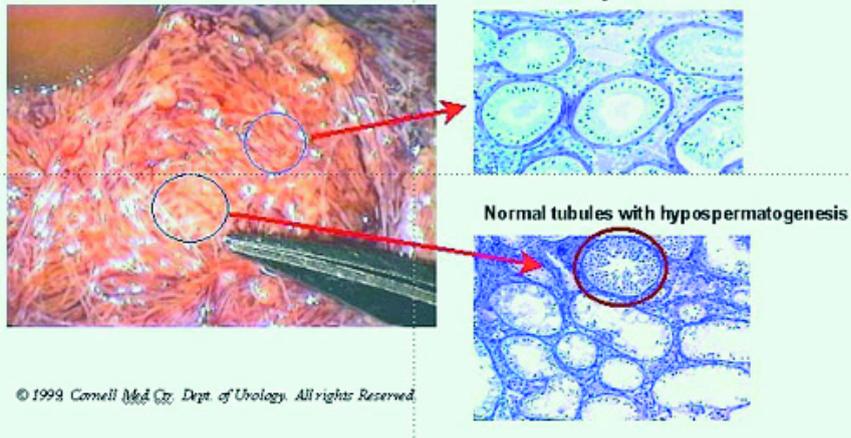
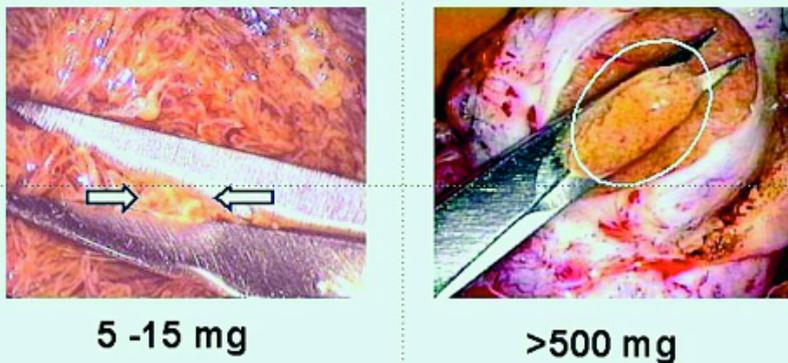


Fig. 10: Quadro intraoperatorio di Micro-TESE. La freccia superiore indica una zona con tubuli seminiferi sottili, rivestiti da sole cellule di Sertoli. La freccia inferiore indica un'area con tubuli di dimensioni maggiori, al cui interno la spermatogenesi appare conservata

Microdissection TB vs. Conventional TB



© 1999 Cornell Med. Ctr. Dept. of Urology. All rights Reserved.

Fig. 11: Le due immagini intraoperatorie mostrano il prelievo di polpa testicolare tramite microdissezione sequenziale (a sinistra) e con biopsia standard (a destra)

nativa possono effettuarsi prelievi plurimi di volume inferiore, topograficamente distanti. Queste tecniche, come pure la biopsia percutanea, possono creare potenzialmente problemi di devascularizzazione, mettendo a rischio la fragile angioarchitettura arteriosa sottoalbuginea (Fig. 8), per cui dovrebbero essere evitate o praticate con cautela (Schlegel & Su, 1997).

In generale, nelle NOA con il prelievo percutaneo si ottengono tassi di recupero spermatozoario inferiori rispetto a quelli con le tecniche chirurgiche (Friedler et al., 1997). La tecnica della biopsia multipla inizialmente descritta da Devroey et al. (1995) fornisce buoni tassi di recupero sebbene sia necessario ricorrere a molteplici incisioni nella tunica albuginea. Nella nostra esperienza la biopsia unica estesa offre risultati sovrapponibili, con minor rischio sulla vascolarizzazione

Quadro Istologico	% Recupero
SCOS	24% (5/21)
Arresto maturativo	42% (8/19)
Ipospermatogenesi	81% (31/39)

Tab. 6. Percentuale di recupero di spermatozoi con la microdissezione di tubuli testicolari in funzione del quadro istologico gonadico.

(SCOS= SINDROME A SOLE CELLULE DI SERTOLI)

ne testicolare, anche se c'è una perdita maggiore di parenchima testicolare (Schlegel et al., 1997). Sfruttando gli aspetti positivi di ambedue le tecniche e con l'ausilio del microscopio operatore abbiamo messo a punto la tecnica della microdissezione dei tubuli testicolari (micro-TESE).

N° cicli	81
Tasso di recupero	58% (47/81)
Tasso di fecondazione	60% (231/386)
Gravidanze cliniche	55% (26/47)
Gravidanze in corso/a termine	40% (19/47)
Gravidanze in corso/a termine sul numero complessivo	23% (19/81)

Tab. 7: Risultati della microdissezione di tubuli testicolari e della ICSI in 81 cicli condotti su pazienti affetti da NOA

2) Estrazione di spermatozoi testicolari mediante microdissezione (Micro-TESE)

Utilizzando l'ingrandimento ottico, viene localizzata una regione relativamente avascolare dell'albuginea testicolare, ideale per effettuare una incisione equatoriale (Schlegel, 1999b; Schlegel & Li, 1999).

Una volta esposto il parenchima, i singoli tubuli testicolari sono esaminati ad un ingrandimento di 20/25x, riconoscendo i vasi sanguigni frammisti ad essi (Fig. 9). I tubuli seminiferi dove la spermatogenesi risulta conservata appaiono solitamente più grandi e più opachi rispetto a quelli sclerotici o a quelli contenenti solo cellule del Sertoli (Fig. 10)

Si procede quindi alla microdissezione sequenziale di singoli tubuli testicolari, asportando globalmente meno di 10 mg di parenchima (fig. 11).

Confrontando i risultati di una serie di TESE effettuate sia con microdissezione di tubuli seminiferi (9,4 mg parenchima), sia con biopsia standard (720 mg di parenchima adiacente alla sede della microdissezione), Schlegel ha dimostrato che la microdissezione aumenta i tassi di recupero di spermatozoi dal 45% (10/22) al 63% (17/27) ed il numero di spermatozoi estratti (160.000 vs. 64.000) con $p < 0.05$ per entrambi i confronti.

La microdissezione di tubuli testicolari è una tecnica più sicura e più efficiente per l'estrazione di spermatozoi in pazienti affetti da NOA (tab. 6).

I risultati ottenuti nel 1998 alla Cornell University su 81 cicli di microdissezione di tubuli testicolari in pazienti affetti da NOA sono riportati nella tabella 7.

Crioconservazione degli spermatozoi epididimari e testicolari

Una buona crioconservazione di spermatozoi consente di ripetere molteplici cicli di ICSI, senza ricorrere a ulteriori recuperi chirurgici. La ICSI con spermatozoi crioconservati fornisce tassi di fecondazione sovrap-

ponibili a quelli ottenuti con spermatozoi “a fresco”, con il vantaggio di separare temporalmente il recupero degli spermatozoi da quello degli oociti.

Nei casi di OA i tassi di gravidanza con spermatozoi freschi o crioconservati sono pressoché identici, mentre nei casi di NOA è preferibile l'utilizzo di spermatozoi freschi. Infatti nelle NOA la crioconservazione di spermatozoi risulta difficoltosa a causa del loro basso numero e della assenza di motilità, che non consente, una volta scongelati, di verificarne la vitalità. Tuttavia, rapporti aneddotici hanno dimostrato che è possibile criopreservare campioni di tessuto ottenuti con biopsia testicolare ed estrarre gli spermatozoi dopo lo scongelamento, consentendo l'ottenimento di gravidanza.

Conclusioni

Allo stato attuale è possibile recuperare spermatozoi dal testicolo o dalle vie seminali in pazienti affetti da OA o da NOA, ottenendo con la ICSI tassi di gravidanza eccellenti in caso di OA ed accettabili in caso di NOA. I continui progressi nelle tecniche di crioconservazione degli spermatozoi epididimari e testicolari hanno progressivamente ridotto la necessità di ricorrere a successivi prelievi chirurgici temporizzati al pick-up oocitario. Questi progressi nel recupero degli spermatozoi e nella fecondazione assistita hanno profondamente modificato l'approccio alle coppie con maschio azoospermico che, solo pochi anni fa, potevano esclusivamente ricorrere all'inseminazione eterologa o all'adozione.

Poiché alcune forme di azoospermia risultano associate ad anomalie genetiche, è consigliata un'attenta diagnosi attraverso il cariotipo, lo studio delle delezioni del cromosoma Y e lo studio delle mutazioni del gene della fibrosi cistica.

Prelevi multipli o ripetuti di parenchima testicolare per TESE possono provocare alterazioni temporanee o permanenti della funzio-

ne gonadica, incluse l'atrofizzazione del testicolo e la riduzione dei livelli di testosterone. Di conseguenza, il recupero dello spermatozoi dovrebbe essere effettuato da medici esperti, preferibilmente con l'utilizzo di un microscopio operatore.

In generale, in caso di ostruzione delle vie seminali, l'individuazione degli spermatozoi di migliore qualità avviene nella porzione prossimale dell'epididimo, nel dotto deferente e nella rete testis. Nelle porzioni immediatamente prossime alla sede dell'ostruzione gli spermatozoi risultano solitamente degenerati.

Quando nelle OA non si riesce ad aspirare spermatozoi dall'epididimo è possibile recuperare spermatozoi dal testicolo. In questo caso i tassi di fertilizzazione e di gravidanza sono risultati soddisfacenti, sebbene inferiori rispetto a quelli ottenuti utilizzando spermatozoi epididimari prelevati microchirurgicamente (tasso di fertilizzazione 45%; tasso di gravidanza 52%).

Nella nostra esperienza su più di 150 procedure MESA svolte alla Cornell University, il recupero di spermatozoi dall'epididimo con questo metodo è stato possibile in oltre il 99% dei casi. La concentrazione e la motilità degli spermatozoi epididimari recuperati con la MESA sono migliori rispetto a quelle ottenute negli stessi pazienti mediante il metodo TeFNA o con la biopsia testicolare percutanea, sebbene queste ultime non necessitino di esperienza microchirurgica e risultino meno invasive.

In conclusione, la procedura MESA costituisce un'ottima scelta per il recupero degli spermatozoi e per la successiva crioconservazione nei pazienti affetti da OA.

Orientamenti futuri

Si può ipotizzare che nel prossimo futuro verranno ulteriormente affinate le procedure di recupero di spermatozoi, di crioconservazione e di fertilizzazione in vitro.

Già ora si sta studiando l'efficacia della ICSI utilizzando spermatidi in pazienti affetti da

NOA e sono state segnalate le prime gravidanze a termine. Anche il trapianto di spermatozoni, studiato finora su modelli animali, sembra essere prossimo all'applicazione sugli umani.

Tuttavia, poiché molti uomini affetti da NOA possono avere anomalie genetiche, tutti questi trattamenti devono essere praticati con cautela prima che possano essere accettati come terapie standard.

Non è ancora stato chiaramente stabilito se il recupero di spermatozoi con TeFNA o biopsia percutanea ha la stessa efficacia in termini di gravidanza evolutiva rispetto alla MESA. Quest'ultima risulta ampiamente sperimentata e fornisce risultati brillanti sia in termini di recupero che di affidabilità nella crioconservazione. La TeFNA e biopsia percutanea risultano meno invasive, consentono il recupero di un minor numero di spermatozoi, tuttavia sufficiente per ottenere buoni risultati in termini di gravidanza nei soggetti affetti da OA.

Infine è importante sottolineare che i Centri di Infertilità non dovrebbero limitare le opzioni di trattamento da proporre alle loro coppie in funzione delle proprie limitazioni tecnologiche, ma dovrebbero sempre proporre e l'opzione della ICSI con spermatozoi recuperati chirurgicamente e la possibilità di un recupero degli spermatozoi con tecnica microchirurgica al fine di limitare il numero delle procedure chirurgiche a cui il maschio azoospermico dovrebbe altrimenti sottoporsi.

BIBLIOGRAFIA

Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem A, Silber S.

Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 10:1457-1460, 1995.

Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Soffer Y, Komarovskiy D, Ron-El R.

Testicular sperm extraction by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with

non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 12: 1488-1493, 1997

Girardi SK & Schlegel PN.

Microsurgical epididymal sperm aspiration: review of techniques, preoperative considerations, and results. J Androl 1:5-9, 1996.

Girardi SK, Mielnik, Schlegel PN.

Submicroscopic deletions of the Y chromosome in infertility men. Hum Reprod 12: 1635-1641, 1997.

Jow WW, Steckel J, Schlegel PN, Magid MS, Goldstein M.

Motile sperm in human testis biopsy specimens. J Androl 14:194-198, 1993.

Mak Z & Jarvi K.

Genetics of male infertility. J. Urol 156:1245-1257, 1996.

Matthews GJ & Goldstein M.

A simplified method of epididymal sperm aspiration. Urology 47:123-125, 1996.

Ostad M, Liotta D, Ye Z, Schlegel PN.

Testicular sperm extraction with optimized tissue dispersion. Urology 52:692-697, 1998.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC.

Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte.

Lancet 340:17, 1992.

Palermo GD, Schlegel PN, Colombero LT, Zaninovic N, Moy F, Rosenwaks Z.

Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. Hum Reprod 11: 1023-1029, 1996.

Schlegel PN, Berkeley AS, Goldstein M, Cohen J, Alikani M, Adler A, Gilbert BR, Rosenwaks Z.

Epididymal micropuncture with in vitro fertilization and oocyte micromanipulation for the treatment of unreconstructable obstructive azoospermia. Fertil Steril 61:895-901, 1994.

Schlegel PN & Su LM.

Physiology consequences of testicular sperm extraction. Hum Reprod 12: 1688 - 1692, 1997.

Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M, Menendez S, Zaninovic N, Veeck LL, Rosenwaks Z.

Testicular sperm extraction with ICSI for

non-obstructive azoospermia. *Urology*, 49: 435-440, 1997.

Schlegel PN.

Microsurgical techniques of epididymal and testicular sperm retrieval. In: *Surgery for Male Infertility - Atlas of the Urologic Clinic of North America*, M. Goldstein (Ed.), Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 109-129, 1999a.

Schlegel PN.

Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 14:131-135, 1999b.

Schlegel PN & Li PS.

Microdissection TESE: testicular sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. Video and abstract (V-16) presented at the 94th Annual Meeting of American Urologic Association, Dallas, May 1-6, 1999.

Sheynkin YR & Schlegel PN.

Sperm retrieval for assisted reproductive technologies.

Contemporary OB/GYN 15: 113-129, 1997.

Sheynkin YR, Ye Z, Menendez S, Liotta D, Veeck LL, Schlegel PN

Controlled comparison of percutaneous and microsurgical sperm retrieval in men with obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 13(11): 3086-3089, 1998.

Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem AC.

Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 9:1705-1709, 1994.

APPENDICE

MICROINIEZIONE INTRACITOPLASMATICA DEL SINGOLO SPERMATOZOO

Francesca Taricco e Eleonora Cefalù*

Servizio di Andrologia, Ospedale San Paolo - Polo Universitario (Milano)

* Centro di Biologia della Riproduzione (Palermo)

Introduzione

E' indiscusso ormai da diversi anni il successo della microiniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI). Avviata con esito favorevole nei laboratori di sterilità per risolvere i casi in cui la fecondazione in vitro convenzionale non era in grado di dare buoni risultati (*Palermo et al., 1992*), ha accresciuto rapidamente il suo successo anche nel trattamento delle infertilità maschili più severe. Criptozoospermie, severe oligozoospermie, astenozoospermie e teratozoospermie, sono tutte condizioni che hanno trovato una soluzione al problema della fertilizzazione in vitro grazie all'ICSI; attualmente le casistiche mondiali dimostrano l'efficacia della tecnica anche nelle azoospermie ostruttive e non ostruttive (*Kahraman et al., 1996; Colpi et al., 1999; Van den Bergh et al., 1999*). Con il perfezionamento delle metodiche di laboratorio e delle tecniche di prelievo chirurgico degli spermatozoi, quali l'aspirazione microchirurgica dall'epididimo (MESA) o il diretto recupero da polpa testicolare (TESE), i risultati in termini di fertilizzazione e gravidanze riportate dai maggiori Centri a livello mondiale sono comparabili con quelli ottenuti con ICSI con spermatozoi da eiaculato (*Silber et al., 1995; Tournaye et al., 1996; Schlegel, 1998*). Oggi non solo si parla di gravidanze e successi di fertilizzazione con l'iniezione intracitoplasmatica di spermatidi, ma anche di colture di cellule della linea spermatogenetica per ottenere la maturazione degli spermatozoi in laboratorio (*Tesarik et al., 1995; Tesarik et al., 1998; Tesarik et al., 1999*). La sterilità maschile sembra quindi aver trovato una strada per giungere ad un rimedio anche nei casi più disperati.

Il laboratorio: struttura e apparecchiature specifiche.

Data la complessità delle tecniche e la delicatezza del materiale biologico trattato, come appunto gameti ed embrioni umani, è indispensabile per il successo di un laboratorio A.R.T. (Assisted Reproductive Technology) avere un'adeguata organizzazione strutturale dei locali in cui si opera, nonché un minuzioso e continuo controllo di qualità. Il laboratorio deve essere necessariamente isolato da altri locali, essere dotato di una zona filtro prima dell'ingresso (possibilmente con una porta automatica), di pavimenti, pareti, piani d'appoggio e sgabelli facilmente lavabili, e di lampade UV e sistema elettrico autonomo. Il personale addetto deve accedere al laboratorio indossando divisa, calzature, cuffie e mascherine adeguate e pulite, utilizzate solo ed esclusivamente all'interno del laboratorio. E' consigliabile avere un continuo riciclo d'aria filtrata ed un climatizzatore a norma come previsto anche per le sale operatorie: la temperatura ottimale dovrebbe aggirarsi intorno ai 25 C° ed essere mantenuta costante in modo che le cellule manipolate non subiscano eccessivi sbalzi di temperatura. Infine è preferibile che il laboratorio e la sala operatoria, dove sono eseguiti i prelievi ovocitari e i trasferimenti degli embrioni, siano attigui e collegati tra loro da una porta o da una piccola finestra.

La preparazione dei campioni seminali avviene, sempre in regime di sterilità, generalmente in un laboratorio attiguo a quello dove sono manipolati ovociti ed embrioni; essa richiede l'uso di una cappa con termoblock, di un microscopio ottico per la lettura

dei parametri seminali, di una centrifuga e di un termostato a secco a 37°C per la fluidificazione del liquido seminale o il mantenimento di materiale biologico proveniente da prelievi chirurgici dal testicolo o dalle vie seminali. Nel laboratorio dove si svolgono la ricerca degli ovociti durante il prelievo ovocitario e le inseminazioni e la preparazione degli embrioni per il transfer, occorrono diverse apparecchiature: almeno una cappa a flusso laminare orizzontale, abbastanza grande da contenere uno o due stereomicroscopi con piano riscaldato e un miniincubatore da tavolo a 37°C e 5% di CO₂, almeno due incubatori a 37°C e 5% di CO₂ per il mantenimento in coltura dei gameti e degli embrioni, e un frigorifero con congelatore per il mantenimento dei terreni di coltura. Nei laboratori in cui è previsto il congelamento di embrioni e di ovociti, occorre considerare anche uno spazio per la collocazione del Planer e dei contenitori criobiologici di stoccaggio, al di fuori della camera biologica e in ambiente aerabile.

In particolare, per la microiniezione si utilizza un invertoscopo (o microscopio rovesciato) più un sistema di micromanipolazione, il tutto posto su adeguato tavolo stabile, meglio se di marmo (fig. 1). L'invertoscopo permette di osservare cellule contenute in recipienti come fiasche o piastre di varie forme e dimensioni, ed è dotato di un piano d'appoggio riscaldato a temperatura costante di 37°C. Per ottenere immagini pseudo 3D (tri-



Fig. 1: Intero sistema per la microiniezione: invertoscopo e strumenti di micromanipolazione.

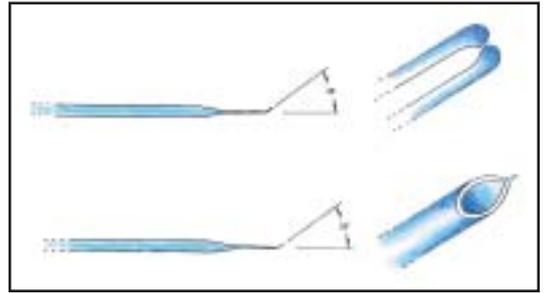


Fig. 2: Holding e Injection con visione ingrandita della punta.

dimensionali) di ottima qualità è inserito un sistema ottico chiamato "contrasto di Hoffman" che consente di lavorare nelle migliori condizioni ottiche.

I microstrumenti necessari per l'ICSI sono due: l'holding-pipette (sinteticamente "holding") con diametro interno di 15 µm per trattenere l'ovocita, e l'injection-pipette (sinteticamente "injection") con diametro interno di 5 µm, per iniettare lo spermatozoo, entrambi con angoli di 35° (fig. 2): posizionarli correttamente è la parte più delicata della messa a punto dello strumento, e sicuramente la più importante ai fini della buona riuscita della microiniezione. L'holding e l'injection, una volta montati nel loro supporto, devono risultare entrambi paralleli al piano di lavoro e posti esattamente l'uno di fronte all'altro. Il micromanipolatore prevede un sistema per regolare questi microstrumenti nelle tre direzioni x - y - z, sia manualmente sia con un sistema motorizzato (motor-driven). Due joystick, collegati al supporto dei microstrumenti da tre tubicini di teflon contenenti olio di paraffina, rappresentano un meccanismo operativo di tipo idraulico ad olio separato da tutto il resto dell'apparecchiatura, che converte i movimenti manuali in micromovimenti, assicurando una manipolazione delle cellule delicata e priva di vibrazioni o di bruschi spostamenti (fig. 3). I due microiniettori, uno per l'holding e uno per l'injection, sono costituiti da una siringa contenente olio di paraffina, montata su un supporto e collegata con un tubicino di teflon alla bacchetta di metallo terminale in cui sono inseriti i microstrumenti (fig. 4).

Questo sistema consente un'iniezione e una

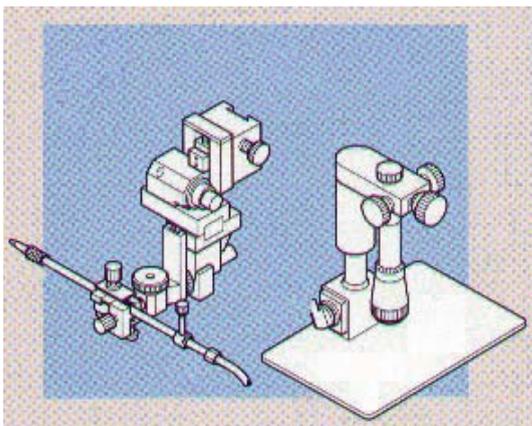


Fig. 3: Joystick e supporto di un microstrumento (*holding o injection*)

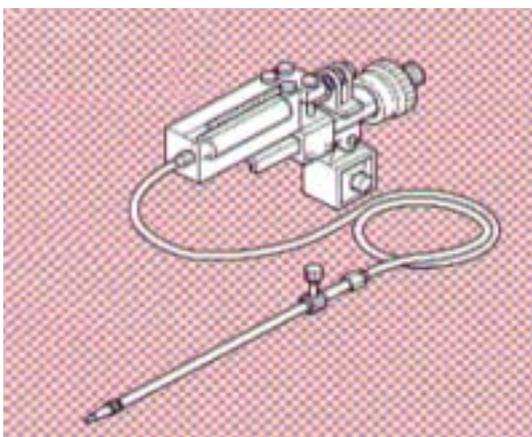


Fig. 4: Microiniettore

aspirazione estremamente precisa, con perfetta corrispondenza tra comando e reale azione.

Il laboratorio ICSI può prevedere anche delle apparecchiature per la preparazione dei microstrumenti: un puller per tirare i capillari di vetro ed una microforgia per tagliare e piegare all'angolatura desiderata il capillare. La punta dell'holding è arrotondata sempre con l'ausilio della microforgia, mentre la punta a "becco di flauto" per l'injection è creata utilizzando una mola.

Iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo: aspetti tecnici.

Alcuni Autori riportano scarsi risultati da ICSI effettuate con spermatozoi non mobili (*Nijs et al., 1996; Bachtell et al., 1999*). D'altra parte nel caso di criptozoospermie severe o di spermatozoi recuperati chirurgicamente, e soprattutto dopo congelamento e scongelamento, non è affatto difficile trovarsi in presenza di spermatozoi esclusivamente immobili e pertanto di dubbia vitalità. In tali casi è possibile considerare lo Swelling Test come prova di vitalità, in quanto esso permette di utilizzare per la microiniezione lo spermatozoo "identificato" come vitale. Il test consente d'avere informazioni sull'integrità funzionale di membrana dello spermatozoo verificandone la semipermeabilità. Ponendo lo spermatozoo in una soluzione ipo-osmotica (es: soluzione salina di sodio citrato e fruttosio diluita), è possibile verificarne la vitalità dal rigonfiamento del flagello dato dall'afflusso d'acqua all'interno della cellula stessa; il fenomeno riguarda soprattutto la coda poiché la testa è molto più compatta e la sua capacità di richiamare acqua è molto modesta (fig. 5)(*Turek & Smikle, 1996; Casper et al., 1996; Liu et al., 1997*).



Fig. 5: Swelling Test: diversi gradi di rigonfiamento della coda.

Tecnicamente la procedura è abbastanza semplice: utilizzando il microago si può spostare lo spermatozoo prima nella microgoccia di soluzione ipo-osmotica, poi in una microgoccia di terreno di lavaggio ed infine, prima della microiniezione, in una microgoccia di terreno contenente polivinilpirrolidone

(pvp). Il pvp è una sostanza viscosa che rallenta il movimento degli spermatozoi mobili facilitandone l'immobilizzazione e la "cattura"; la sua viscosità ne consente un ottimale controllo del flusso durante la microiniezione. Dopo circa 3-4 ore dal prelievo ovocitario, le cellule uovo recuperate (fig. 6) sono decoronizzate con l'ausilio dell'enzima ialuronidasi (Hya) e di pipette Pasteur assottigliate alla fiamma (o micropipette già pronte), con diametro di circa 140 - 150 μm . L'eliminazione delle cellule della granulosa e della corona radiata che circondano l'ovocita è molto importante poiché consente di rivelarne la maturità; tuttavia la permanenza dell'ovocita in ialuronidasi deve essere limitata a pochi secondi, al fine di non danneggiare o "attivare" la cellula stessa.



Fig. 6: Ovocita maturo al prelievo ovocitario circondato dalle cellule della corona radiata: la freccia indica il globulo polare.

Per questa procedura si può comodamente allestire una piastra a 4 pozzetti in modo tale che nel primo pozzetto sia contenuto il terreno con Hya, e nei rimanenti tre terreno di lavaggio con Hepes, il tutto sotto olio di paraffina equilibrato per mantenere il più possibile costanti il pH e l'osmolarità del terreno. Gli ovociti denudati possono essere quindi posti nella piastra preparata per eseguire l'ICSI ed osservati all'invertoscopio per identificarne la maturità. Possono essere iniettati solo gli ovociti in metafase II, cioè che hanno cominciato la 2^a divisione meiotica estrudendo il primo globulo polare (corpo

cellulare contenente metà del corredo cromosomico). Gli ovociti degenerati, di solito ben distinti per il loro aspetto irregolare e colore molto scuro, sono scartati poiché non vitali. La degenerazione può verificarsi a qualunque stadio del processo di maturazione all'interno del follicolo: perciò è possibile avere ovociti degenerati immaturi, maturi o post-maturi. Gli ovociti immaturi sono caratterizzati dalla presenza di un grande nucleo, detto vescicola germinale: si tratta di cellule immature bloccate alla 1^a divisione meiotica con corredo cromosomico ancora diploide, che pertanto non possono essere iniettate (fig. 7). Per tali ovociti ci sono scarse possibilità di maturazione in vitro e, qualora essi maturino fino alla metafase II, le probabilità di ottenere una fecondazione seguita da "cleavage" (scissione cellulare e crescita dell'embrione) sono in ogni caso molto basse. Gli embrioni che derivano da queste inseminazioni mostrano inoltre un alto tasso di anomalie genetiche (per lo più aneuploidie) o comunque presentano spesso blastomeri multinucleati (Nogueira *et al.*, 2000). Gli ovociti in metafase I, stadio intermedio tra la vescicola germinale e la metafase II, sono invece posti in coltura e osservati in un secondo tempo (almeno 4 ore dopo) per verificare l'eventuale estrusione del 1° globulo polare: dopo ciò possono essere iniettati.



Fig. 7: Ovocita immaturo al prelievo ovocitario: le cellule della corona radiata appaiono fortemente compatte e all'interno del citoplasma è visibile la vescicola germinale.

La piastra in cui si esegue l'ICSI, può essere così allestita: al centro si pone una microgoccia da circa 5 μ l di terreno contenente polivinilpirrolidone (pvp), in cui è posta una piccolissima quantità di sospensione di spermatozoi, e attorno 4 - 6 microgocce di terreno con Hepes da 8 μ l ciascuna, nelle quali sono posti gli ovociti (uno per microgoccia); il tutto deve essere coperto con olio di paraffina equilibrato. Una volta che la piastra è pronta, si procede posizionando il microago a fuoco con il pvp per caricarne una piccola quantità. Quando sono presenti spermatozoi mobili, questi sono ovviamente "prescelti" per la microiniezione: ogni spermatozoo viene immobilizzato colpendone la coda con la punta del microago, se necessario anche ripetutamente (Fig.8a,b). Alcuni autori hanno recentemente messo in evidenza l'importanza di questa procedura ai fini della fertilizzazione, poiché tale azione indurrebbe la reazione acrosomiale grazie ad una depolarizzazione della membrana. Studi su mancate fertilizzazioni dopo iniezioni di spermatozoi intatti hanno evidenziato la mancata decondensazione degli stessi (*Vanderzwalmen et al., 1996*). Una volta immobilizzato lo spermatozoo, questo è aspirato per la coda con il microago (precedentemente caricato di pvp) in modo tale che la testa sia poi la prima a penetrare nell'ovocita (Fig.8c,d). Dopo aver posizionato la piastra ICSI per entrare nel campo visivo della microgoccia contenente la cellula uovo, si avvicina l'holding all'ovocita; con esso si aspira dolcemente l'ovocita fino ad assicurarsi che sia ben fermo, cercando di posizionarlo con il globulo polare alle ore 12 o alle ore 6. Il microago, con lo spermatozoo in punta, viene a trovarsi quindi alle ore 3 dell'ovocita e viene avvicinato alla zona pellucida. Quando tutto è sotto controllo si penetra con l'injection nell'ovocita. Ci si assicura di rompere la sua membrana e di entrare nel citoplasma esercitando con l'injection una lieve pressione negativa (si aspira cioè il citoplasma stesso) fino a che non si osserva un aumento improvviso del flusso dentro il microago: quindi si reinietta dolcemente il citoplasma aspirato insieme allo

spermatozoo, evitando di introdurre pvp. Infine si estrae l'injection, e si rilascia l'ovocita dall'holding (figg. 9a-9e). Studi che mettono a confronto diverse metodiche d'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo hanno dimostrato che sia l'immobilizzazione dello spermatozoo che la rottura dell'oolemma con aspirazione del citoplasma dell'ovocita sono entrambe due "step" fondamentali per ottenere buoni risultati. La rottura della membrana plasmatica e l'aspirazione del citoplasma (che viene in seguito reiniettato nell'ovocita) non solo garantiscono che lo spermatozoo sia entrato, ma permettono l'apertura dei canali del calcio (Ca^{++}) e quindi l'attivazione dell'ovocita (*Wanderzwalmen et al., 1996*). Entrambe le procedure sono però molto delicate e richiedono particolare attenzione per non danneggiare la cellula uovo. La scelta della posizione del globulo polare durante la microiniezione, invece, è dovuta al fatto che generalmente il fuso meiotico delle cellule uovo è posizionato al di sotto del globulo polare. Alcuni autori riportano migliori risultati in termini di fertilizzazione con ICSI effettuate posizionando il globulo polare alle ore 6 piuttosto che alle ore 12 (*Van der Westerlaken et al., 1999*). D'altra parte è stato anche dimostrato che il globulo polare non resta sempre legato al suo sito, ma può subire spostamenti anche importanti, soprattutto durante la decoronizzazione; pertanto, non essendo sempre lo stesso un valido riferimento, non si può mai escludere un eventuale danneggiamento del fuso mitotico con l'introduzione del microago, potenzialmente letale (*Hewitson et al., 2000*). Tutti i passaggi che riguardano le manipolazioni degli ovociti (soprattutto l'ICSI) dovrebbero essere eseguiti il più rapidamente possibile, per evitare che le cellule uovo permangano troppo a lungo sia al di fuori dell'incubatore che in medium con Hepes. In tale sostanza, che aiuta a mantenere il pH costante, è meglio che gli ovociti rimangano solo il tempo più breve possibile. Una volta microiniettati tutti gli ovociti della piastra, li si passa in terreno di coltura e li si pone in incubatore. Se la microiniezione va a buon fine, hanno

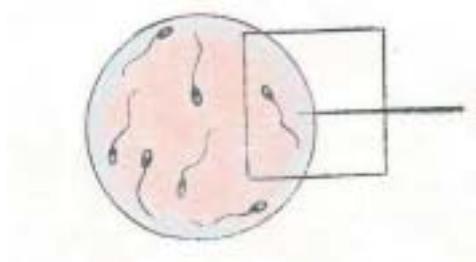
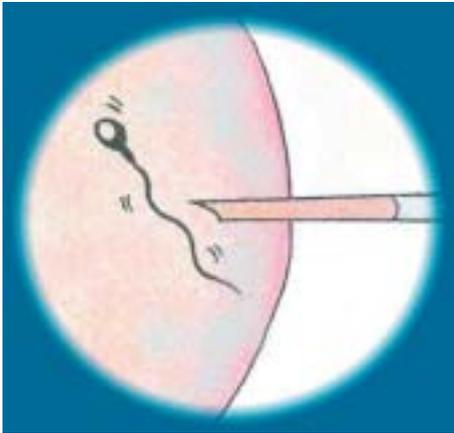
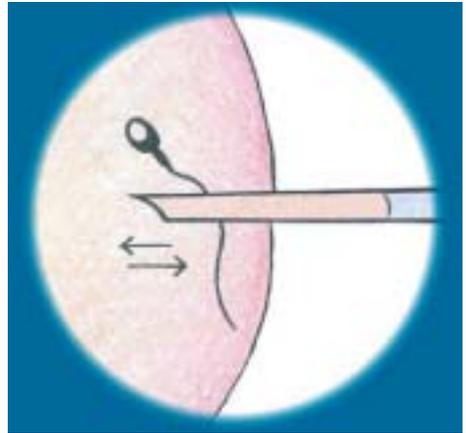


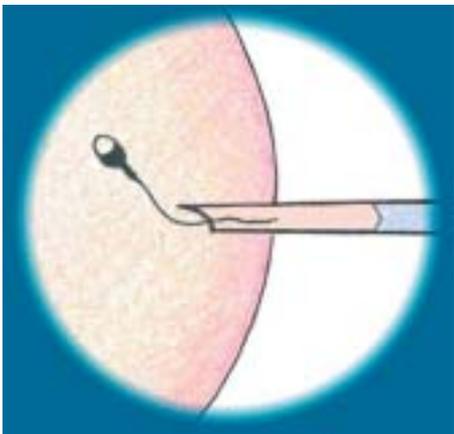
Fig. 8 : *Tecnica di immobilizzazione ed aspirazione dello spermatozoo per ICSI (a-d)*



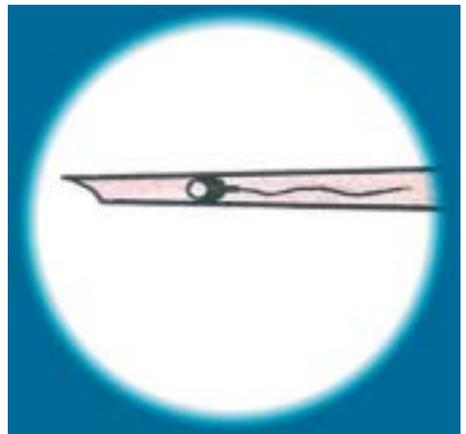
a



b



c



d

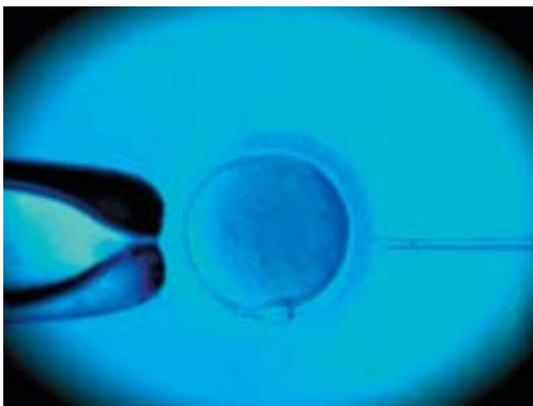


Fig. 9a: L'ovocita è trattenuto dalla micropipetta con il globulo polare alle ore 6, mentre alle ore 3 è posizionato il microago con lo spermatozoo in punta.

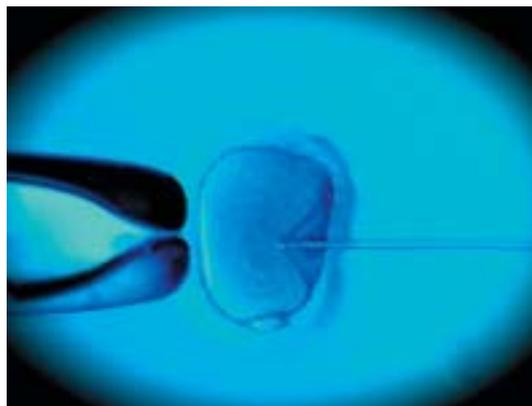


Fig. 9b: Il microago attraversa la zona pellucida e spinge per rompere la membrana plasmatica e penetrare nel citoplasma dell'ovocita.

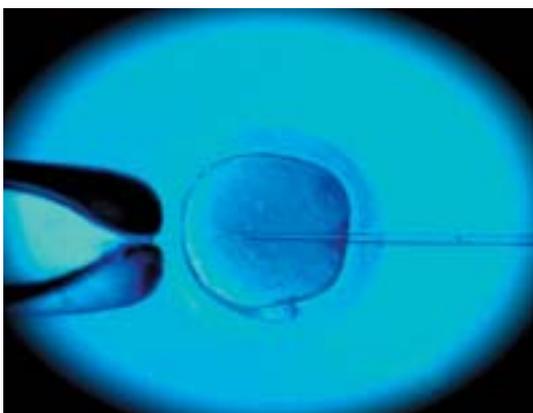


Fig. 9c: Viene aspirato citoplasma e lo spermatozoo indietreggia all'interno del microago.

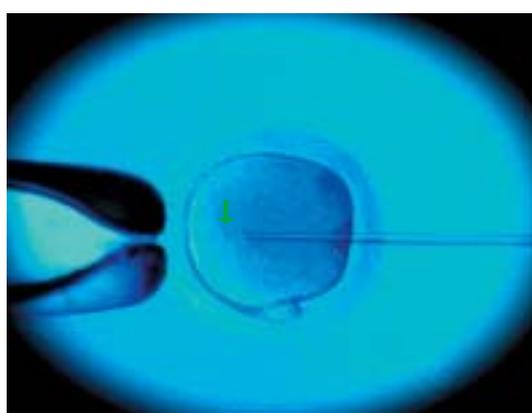


Fig. 9d: Viene reinserito il citoplasma aspirato insieme allo spermatozoo (freccia verde).

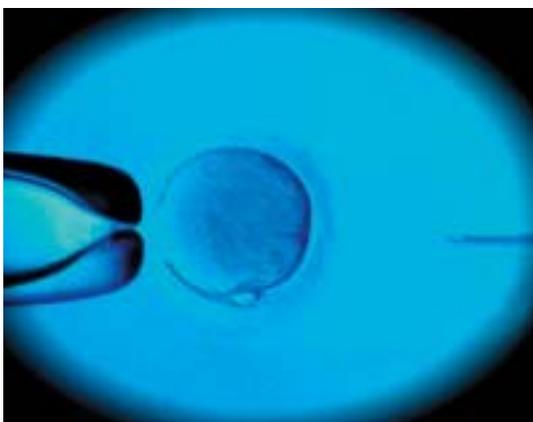


Fig. 9e: Il microago viene estratto e per alcuni secondi rimane nell'ovocita il solco lasciato dal suo passaggio.

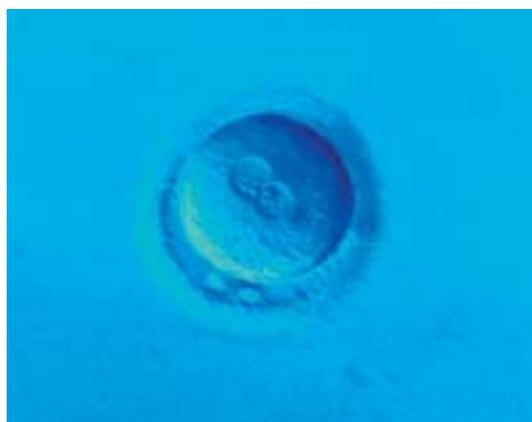


Fig. 10: Ovocita fertilizzato a 18 ore circa dalla microiniezione: sono ben visibili i due pronuclei e i due globuli polari tra le ore 6 e le ore 7.



Fig. 11a: Embrione di 1° grado a circa 44 ore dalla microiniezione: sono visibili 4 blastomeri sullo stesso piano di fuoco.

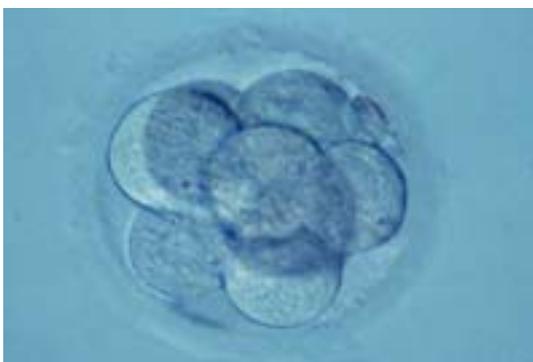


Fig. 11b: Embrione di 1° grado a circa 68 ore dalla microiniezione: sono visibili 8 blastomeri su diversi piani di messa a fuoco.

inizio eventi come il completamento della 2ª divisione meiotica dell'ovocita, con estrusione del 2° globulo polare e formazione del pronucleo aploide femminile; al tempo stesso il nucleo dello spermatozoo si decondensa formando il pronucleo maschile (fig. 10). I due pronuclei maschile e femminile in seguito si fondono: può allora incominciare il processo di singamia che porta alla formazione dei blastomeri che costituiscono l'embrione (foto 11a-11b).

È consigliabile allestire piastre di coltura con microgocce di terreno di 30-50 µl che contengano soltanto un'ovocita; questo facilita il giorno dopo (a 16 - 18 ore) la differenziazione degli zigoti che hanno avuto un'anormale fertilizzazione (presenza di 2 pronuclei: femminile e maschile) da quelli che non si sono fertilizzati normalmente.

Mentre nella fecondazione classica si è

dimostrato che la presenza di un pronucleo è spesso segno di ovocita fecondato in cui si è avuta una formazione asincrona dei pronuclei maschile e femminile, la presenza di un solo pronucleo dopo ICSI indica molto probabilmente un'attivazione dell'ovocita per partenogenesi: tuttavia può anche accadere che sia la placca metafasica diploide ad organizzarsi in realtà in un singolo pronucleo (Cohen *et al.*, 1999). L'orario di controllo della fertilizzazione è molto importante a questo riguardo: un ritardo, infatti, può portare ad identificare un solo pronucleo anche in ovociti che in realtà si sono normalmente fertilizzati e che fino a poco prima presentavano due pronuclei in seguito fusi assieme. L'estrusione del secondo globulo polare potrebbe aiutare l'identificazione dell'avvenuta normale fertilizzazione, ma non sempre i due globuli polari sono ben distinguibili. Occorre tenere presente anche che non tutti gli ovociti fecondati hanno gli stessi tempi di sviluppo: infatti alcuni possono mostrare la presenza dei due pronuclei anche solo dopo poche ore dalla microiniezione (Nagy *et al.*, 1998). La presenza di tre pronuclei invece è indice di poliploidia: nell'ICSI si parla di diginia, ovvero di ritenzione del secondo globulo polare durante la fecondazione, mentre nella FIVET si può anche trattare di dispermia (errore nel blocco della polispermia). La poliploidia può verificarsi inoltre, anche se più raramente, quando lo spermatozoo o l'ovocita sono già portatori di un doppio corredo cromosomico. Molte delle fertilizzazioni anomale possono dare origine ad embrioni che appaiono morfologicamente normali: è importante che nella fase di controllo dei pronuclei esse siano distinte dalle fertilizzazioni normali in quanto i loro embrioni non devono essere trasferiti.

Registrando le microgocce e i rispettivi ovociti microiniettati in una Cartella Biologica si può eseguire uno studio approfondito sulla procedura, ed ottenere molti dati interessanti sull'eventuale fertilizzazione di quegli ovociti che, anche se sono in metafase II, presentano caratteristiche anomale (quali: vacuoli, zone pellucide ovali, zone pellucide

"spesse", spazio perivitellino troppo grande, citoplasma troppo scuro o granulare ecc...) che li distinguono dagli ovociti di buona qualità. La classificazione degli embrioni che si effettua a circa 48 ore dal prelievo ovocitario si basa sul giudizio dato con l'osservazione dei blastomeri e sul grado di frammentazione degli stessi. Schematicamente si possono considerare embrioni di buona qualità quelli con blastomeri di forma e dimensione regolare ed assenza completa di frammenti (1° Grado) o con blastomeri la cui forma e/o dimensione non è del tutto regolare e la cui frammentazione non supera il 10% (2° Grado). Gli embrioni che non sono di buona qualità presentano blastomeri la cui forma e/o dimensione non è regolare ed il cui grado di frammentazione raggiunge il 30% (3° Grado) o il 50% (4° Grado). Infine sono considerati molto scadenti gli embrioni molto frammentati (per oltre il 50%), in cui il numero dei blastomeri è infatti di difficile identificazione (5° Grado). Molti Centri prediligono il transfer in terza giornata (a 72 ore), perché ciò consente di avere un miglior giudizio sulla vitalità embrionaria. Normalmente dopo 48 ore, ci si attende embrioni a 4 cellule, ma a 72 ore l'embrione vitale dovrebbe raggiungere uno stadio di almeno 6-8 cellule. D'altra parte, se gli ovociti recuperati sono pochi e sono pochi gli embrioni ottenuti, è preferibile un transfer a 48 ore per evitare che gli embrioni permangano a lungo in vitro, dando così una maggiore chance al loro sviluppo ed al loro attecchimento in utero.

Oggi esistono medium per il proseguimento della coltura degli embrioni che sono arricchiti con vitamine, aminoacidi ed ormoni e consentono di sviluppare in vitro blastocisti (fig. 12a-12b), effettuando il transfer anche in quinta giornata. La blastocisti è lo stadio che l'embrione raggiunge al 5° giorno di sviluppo e in cui si differenziano due tipi di cellule: il trofotoderma (strato cellulare esterno) che darà origine alla placenta, e l'ICM (massa cellulare interna) che darà origine al feto. A questo stadio la blastocisti è formata da circa 100 cellule ed è ancora avvolta dalla zona pellucida. La cavità interna (blastocoele), che

contiene un liquido extracellulare liberato dalle cellule del trofotoderma, tende ad espandersi aumentando il volume della blastocisti. Questa infine fuoriesce dalla zona pellucida intorno al 7° giorno, prima dell'impianto.

La percentuale d'impianto con blastocisti trasferite in 5ª giornata è più alta di quella ottenibile con embrioni trasferiti in 2ª e 3ª giornata: infatti, nel processo di fecondazione naturale, l'embrione allo stadio di 4-8 cellule si dovrebbe trovare ancora a livello tubarico.



Fig. 12a. Embrione umano allo stadio di morula (16 cellule circa) a 4 giorni dall'inseminazione: appare come un ammasso in cui le singole cellule non sono distinguibili.



Fig. 12b. Blastocisti cavitata a 5 giorni dall'inseminazione: si distingue la massa cellulare acentrica all'interno della cavità (ICM).

D'altra parte occorre considerare che soltanto il 20 - 50% degli embrioni può raggiungere in vitro il 5° giorno sviluppando una blastocisti, poiché si attua una selezione degli embrioni più resistenti e vitali. E' necessario valutare bene ogni singolo caso, dato che la probabilità di gravidanza in una donna giovane con transfer in 5ª giornata dell'unica blastocisti ottenuta risulta inferiore (25%) a quella conseguibile con il trasferimento di due o tre embrioni in 2ª o 3ª giornata (40%). In genere quindi si ricorre al transfer con blastocisti nei casi in cui si è recuperato un elevato numero di ovociti e di conseguenza si è ottenuto un buon numero di embrioni, e nei casi in cui la paziente ha alle spalle diversi insuccessi. Ottenere blastocisti comunque può rivelarsi molto utile, in quanto la selezione operata sugli embrioni che vengono mantenuti in terreno di proseguimento, permette di abbattere notevolmente il rischio delle gravidanze multiple (*Fisch et al., 1999; Racowsky et al., 2000*).

Conclusioni

L'ICSI è entrata a far parte delle comuni tecniche di fecondazione assistita pressoché in tutti i centri di sterilità: il successo che ha ottenuto in termini di percentuali di fecondazione, gravidanze e nascite, ha fatto sì che tale tecnica si diffondesse rapidamente, tanto che oggi non è più usata solo come un trattamento per risolvere i casi d'infertilità maschile, ma anche nei casi in cui si prevede il rischio di una mancata fecondazione per cattiva qualità ovocitaria e/o scarso numero di ovociti recuperati, oppure in caso di precedente fallimento della fecondazione in vitro convenzionale (FIVET). Alcuni studi hanno inoltre recentemente dimostrato che i difetti d'interazione tra zona pellucida e spermatozoo sono la causa di maggior fallimento nella FIVET (*Liu & Baker, 2000*). Pertanto in diversi Centri l'ICSI è diventata attualmente la scelta esclusiva di fecondazione in vitro, senza che sia valutata e ponderata bene la sua reale necessità in ogni singolo caso. Non si può dimenticare che molto è ancora

oscuro sulle possibili conseguenze di tale tecnica. Con l'ICSI è bypassato il naturale processo di fecondazione e non sappiamo ancora cosa ciò comporti a livello molecolare, anche se apparentemente otteniamo embrioni e gravidanze del tutto simili a quelle ottenute con la FIVET. Oltre al fatto che rimane ancora da studiare l'effetto a lungo termine su bambini e adulti di una tecnica che non ha dato spazio alla selezione naturale, molte sono ancora le problematiche non sufficientemente chiarite riguardo alla trasmissione delle malattie genetiche e cromosomiche connesse all'infertilità (*Hewitson et al., 1999*). Proprio per questo motivo la genetica pre-impianto sta acquistando un interesse sempre maggiore nel campo della medicina riproduttiva, e non dimentichiamo che occorre anche fare i conti con tutte le problematiche etiche delle bio-tecnologie legate al laboratorio ART (*Menezo et al., 2000*).

L'entusiasmo che l'ICSI ha portato nel campo della sterilità dovrebbe forse essere placato? E' evidente che il suo utilizzo dovrebbe essere consentito solo nei casi in cui non esiste un'alternativa efficace, prediligendo sempre la Fecondazione in vitro convenzionale là dove è possibile.

BIBLIOGRAFIA

Bachtell NE, Conghan J, Turek PJ.

The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 14 (12): 3048-3051, 1999

Casper RF, Cowan L, Meriano JS, Jarvi KA, Cowan L, Lucato ML.

The hyposmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril* 65: 972-976, 1996

Cohen J, Alikani M, Munnè S, Palermo GD.

La micromanipolazione nel trattamento clinico dei disordini della fertilità.

In: Micromanipolazione in Medicina della

Riproduzione. J.E. Buster (ed), Roma, CIC Edizioni Internazionali, pp. 5-24 , 1999

Colpi GM, Negri L, Benaglia R.

Metodiche di recupero di spermatozoi testicolari. In: La Riproduzione Maschile - Fisiopatologia e Clinica. C. Foresta & C. Scandellari (eds), Padova, Cleup editrice, pp. 39-56, 1999.

Fisch JD, Milki AA, Behr B.

Sibling embryo blastocyst development correlates with the in vitro fertilization day 3 embryo transfer pregnancy rate in patients under age 40.

Fertil Steril 71 (4): 750-752, 1999.

Hewitson L, Dominiko T, Takahashi D, Martinovich C, Ramalho-Santos J, Sutovsky P, Fanton J, Jacob D, Monteith D, Neuringer M, Battaglia D, Simerly C, Schatten G.

Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys.

Nt Med 5 (4): 431-433, 1999.

Hewitson L, Simerly C, Dominiko T , Schatten G.

Cellular and molecular events after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection.

Theriogenology 53 (1): 95-104, 2000.

Kahraman S, Ozgur S, Alatas C, Aksoy S, Balaban B, Evrenkaya T, Nuhoglu A, Tasdemir M, Biberoglu K, Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M.

High implantation and pregnancy rates with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia.

Hum Reprod 11(3): 673-676, 1996.

Liu J, Tsai YL, Kats E, Compton G, Garcia JE, Baramki TA.

High fertilization rate obtained after intracytoplasmic sperm injection with 100% non motile spermatozoa selected by using a simple modified hyposmotic swelling test. Fertil Steril 68 (2): 373-375,1997.

Liu DY & Baker HW.

Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. Hum Reprod 15 (3):

702-708, 2000.

Menezo YJ, Veiga A, Pouly JL.

Assisted reproductive technology (ART) in human: facts and uncertainties. Biogenology 53 (2): 599-610, 2000.

Nagy ZP, Jassenswillen C, Jassens R, De Vos A, Staessen C, Van de Velde H, Van Steirteghem AC.

Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injecton (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. Hum Reprod 13 (6): 1606-1612, 1998.

Nijs M, Vanderzwalmen P, Vandamme B, Segal-Bertin G, Lejeune B, Segal L, Van Roosendaal E, Schoysman R.

Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod11(10): 2180-2185, 1996.

Nogueira D, Staessen C, Van de Valde H, Van Steirteghem A.

Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro matured oocytes.

Fertil Steril 74 (2) : 295-298, 2000

Palermo G, Joris H, Devroey P , Van Starteghem AC.

Pregnancy after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. Lancet 2: 17-18, 1992.

Racowsy C, Jackson KV, Cekleniok NA.

The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. Fertil Steril 73 (3): 558-564, 2000.

Schlegel PN.

Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. Hum Reprod, abstract of the 14th Annual Meeting of the ESHRE 1998.

Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P.

High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy.

Hum Reprod 10 (1): 148-152, 1995.

Tesarik J, Mendoza C, Testat J.

Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes.

N Engl J Med 333: 525, 1995.

Tesarik J, Guido M, Mendoza C, Greco E.

Human spermatogenesis in vitro: respective effects of follicle stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and Sertoli cell apoptosis. J Clin Endocrinol Metab 83 (12):4467-4473, 1998.

Tesarik J, Mendoza C, Greco E.

In vitro culture facilitates the selection of healthy spermatids for assisted reproduction. Fertil Steril 72 (5): 809-813, 1999.

Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M, Gossens A, Silber S, Van Steirtghem AC, Devroey P.

Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. Hum Reprod 11 (1): 127-132, 1996.

Turek PJ & Smikle CB.

Viability of nonmotile sperm. Assist Reprod Reviews. 7 (1), 34-38, 1996.

Van den Bergh M, Emiliani S, Biramane J, Vannin AS, Englert Y.

Impact of the introduction of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on the treatment of severe male sterility. Rev Med Brux 20 (5): 453-456, 1999.

Van der Westerlaken LA, Helmerhorst FM, Hermans J, Naaktgeboren N.

Intracytoplasmic sperm injection: position of the polar body affects pregnancy rate. Hum Reprod 4 (10): 2565-2569, 1999.

Vanderzwalmen P, Bertin G, Lejeune B, Nijs M, Vandamme B, Schoysman R.

Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolema.

Hum Reprod 11(3): 540-547,1996.